Année scolaire
1951-1952

THÈSE

N° 2

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

PAR

Raymond-Jean-Paul QUILICHINI

DOCTEUR ÈS SCIENCES (DIPLÔME D'ÉTAT)
CHEF DE TRAVAUX ET CHARGÉ DE COURS COMPLÉMENTAIRE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

né à Toulon (Var), le 25 Juillet 1923

1° — Thèse : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ANALYTIQUE DE L'APIOL. APPLICATIONS GALÉNIQUE ET TOXICOLOGIQUE.

2° — QUESTION PROPOSÉE PAR LA FACULTÉ.

Soutenue le Jeudi 24 Juillet 1952, devant la Commission d'examen.

MM. CASTAGNOU, professeur.. *Président*
DANGEARD, professeur...
MESNARD, professeur.....
CHELLE, professeur honoraire.....
Juges

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1952

Année scolaire
1951-1952

THÈSE

N° 2

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

PAR

Raymond-Jean-Paul QUILICHINI

DOCTEUR ÈS SCIENCES (DIPLÔME D'ÉTAT)
CHEF DE TRAVAUX ET CHARGÉ DE COURS COMPLÉMENTAIRE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

né à Toulon (Var), le 25 Juillet 1923

1° — Thèse : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ANALYTIQUE DE L'APIOL. APPLICATIONS GALÉNIQUE ET TOXICOLOGIQUE.

2° — QUESTION PROPOSÉE PAR LA FACULTÉ.

Soutenue le Jeudi 24 Juillet 1952, devant la Commission d'examen.

MM. CASTAGNOU, professeur.. *Président*
DANGEARD, professeur...
MESNARD, professeur.....
CHELLE, professeur honoraire ..... *Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1952

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE.
DOYEN : M. PORTMANN. — **ASSESSEUR** : M. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL, MACHEBŒUF, CRUCHET.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	N... / CREYX
Clinique chirurgicale	PAPIN / MASSÉ
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	N...
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIÉCHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM.
Médecine expérimentale	N...
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	N...
Clinique des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	BROUSTET

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. PERRENS (Maladies mentales), DUFOUR (Anatomie), BLANQUET (Physique pharmaceutique).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Parasitologie	PAUTRIZEL
Physiologie	Mlle ROUGIER
Bactériologie	MOUSTARDIER

	MM.
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	SARIC / DUBARRY / F.-J.TRAISSAC / BERGOUIGNAN / LENG-LÉVY / POUYANNE
Chirurgie générale	LAUMONIER / CHAVANNAZ
Obstétrique	MAHON / CHASTRUSSE

	MM.
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	MARONNEAUD
Urologie	LANGE

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	DUFOUR
Accouchements	CHASTRUSSE
Puériculture	VERGER / PÉRY
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI / COUSTOU
Anatomie	RIGAUD
Chimie minérale	R. GOLSE
Cryptogamie	LAUBIE

	MM.
Pharmacie galénique	MESNARD
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique	NEUZIL
Chimie analytique	BABIN
Hygiène appliquée	QUILICHINI
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER / VILLAR
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Hydrologie pharmaceutique	CAZAUX

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MES MAITRES

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ANALYTIQUE DE L'APIOL APPLICATIONS GALÉNIQUE ET TOXICOLOGIQUE

INTRODUCTION

La recherche toxicologique de l'apiol dans les viscères est relativement peu fréquente; elle n'a lieu que dans des cas bien définis de décès postabortifs.

Quelques expertises effectuées au laboratoire nous ont montré la difficulté *d'affirmer* sa présence en se basant uniquement sur les techniques classiques; en effet, la technique de Jorissen est difficile à mettre en œuvre sur le résidu impur d'extraction; celle de Labat, très aisée, au contraire, manque de spécificité puisqu'elle caractérise une fonction et non un composé défini; si sa négativité est absolue, sa positivité est relative.

Devant ces faits, nous avons repris la question de l'identification de l'apiol, tant au point de vue analytique que toxicologique, en cherchant à lui appliquer, d'une part, la méthode chromatographique, d'autre part, la réaction hydrostrychnique mise au point au laboratoire pour la diagnose des aldéhydes.

Ce travail comprend plusieurs parties : dans le premier chapitre, nous ferons un rappel succinct des notions classiques sur l'apiol; dans le deuxième chapitre, nous rapporterons les résultats obtenus dans l'étude chromatographique

de solutions alcooliques d'apiol; cette étude a été, en outre, étendue à l'apioside, avec essai d'application galénique à la recherche de cet hétéroside dans l'apiol officinal (Codex, 1937).

Dans le troisième chapitre, nous avons effectué une étude comparative des différentes techniques classiques d'identification et de dosage de l'apiol, et retenu et adapté celles applicables au spot chromatographique.

En outre, en appliquant des systèmes oxydants et hydrolytiques, tant au groupement allylique qu'au groupement dioxyméthylénique, nous avons cherché à créer des groupements aldéhydiques, soit fixés sur la molécule, soit libérés sous forme de formol, permettant de *leur* appliquer l'action du réactif hydrostrychnique mise en évidence sur les aldéhydes et en particulier sur le formol.

Enfin, dans un dernier chapitre, nous avons appliqué les techniques précédentes, soit aux liquides biologiques, soit aux organes d'animaux intoxiqués expérimentalement par l'apiol.

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS SUR L'APIOL

En 1849, la Société de Pharmacie de Paris mit au concours la question suivante : « Découvrir les moyens de préparer artificiellement la quinine, c'est-à-dire sans employer à cette préparation, ni quinquina, ni autre matière contenant de la quinine toute formée. A défaut, faire connaître un produit organique nouveau, naturel ou artificiel, ayant des propriétés équivalentes à la quinine, et qu'il serait possible de mettre commercialement en concurrence avec elle ».

A cette époque, en effet, l'extraction de la quinine à partir des quinquinas subissait une crise grave : les quinquinas les plus riches en quinine, les Calissaya par exemple, étaient l'objet d'une exploitation inintelligente qui menaçait d'en détruire l'espèce. De plus, le commerce anglais qui s'en était assuré le monopole, avait forcé les prix de vente, les fabricants de sulfate de quinine étaient donc obligés de s'adresser à d'autres espèces de quinquina beaucoup moins riches en quinine. Il existait bien d'autres fébrifuges connus depuis des époques reculées, mais on ne pouvait compter sur eux. C'est pourquoi la Société de Pharmacie de Paris mit au concours la recherche d'un succédané de la quinine permettant de remédier à sa pénurie.

Parmi les neuf mémoires reçus par la Société, figurait un travail sur un fébrifuge nouveau : *l'apiol*, par les Docteurs

Joret et Homolle. Ces auteurs, dans leur mémoire, rappelaient tout d'abord que le *persil (Apium petroselinum* Hoffm.) était connu depuis très longtemps comme plante médicinale. Dans l'antiquité. on groupait sous le nom de « selinon » un certain nombre d'ombellifères qui, comme l'ache, étaient réputées comme diurétiques; Dioscoride énumère cinq de ces « selinon » dont le petroselinum qui, dit-il, croît en Macédoine sur les rocailles, et qui, selon toute vraisemblance, correspond à notre persil; c'était pour cet auteur un diurétique, un emménagogue et un excellent produit pour combattre les fièvres. Pline le cite aussi.

Au IX^e^ siècle, largement cultivé, il est employé aux mêmes fins. Au XIII^e^ siècle, son rôle médicinal est oublié au profit de son rôle culinaire. Ce n'est qu'au XIX^e^ siècle que ses propriétés médicinales sont de nouveau mises à l'honneur : Bonhoure (1835), Potot (1836) et Péraire (1841 et 1842) utilisent le suc, la poudre de feuilles, l'hydrolat, le vin, l'extrait et la coction huileuse pour combattre les fièvres d'accès.

Mais il revenait à Joret et Homolle de signaler pour la première fois que *les graines de persil* jouissaient d'une valeur fébrifuge bien supérieure à celle des autres parties de la plante. Cette découverte eut lieu en 1847, en Bretagne. Un des deux auteurs se trouvant en face d'un fébricitant, et étant dans l'impossibilité de lui administrer un fébrifuge, avisa des sommités de persil qui traînaient dans la chambre du malade. Il eut l'idée de lui en administrer une décoction. Malgré l'intensité et la gravité de la fièvre, la guérison du patient fut rapide et complète. Dès ce moment, Joret et Homolle répétèrent les mêmes expériences à l'Hôpital de Vannes et, dans la plupart des cas, la guérison fut obtenue. Ces excellents résultats incitèrent ces auteurs à analyser les graines de persil afin de pouvoir en isoler et identifier le principe actif.

C'est ainsi qu'ils purent en retirer :

1° Une huile essentielle volatile;

2° Une matière grasse cristallisable, solide à la température ordinaire, fusible à + 23°, qu'ils nommèrent « beurre de persil »;

3° De la pectine, ou gelée végétale, susceptible de former de l'acide pectique et des pectates sous l'influence des alcalis;

4° De la chlorophylle;

5° Du tanin, une matière colorante jaune, de l'extractif, du ligneux, des sels anorganiques;

6° Enfin, un liquide jaunâtre huileux, non volatil, plus dense que l'eau, d'une saveur et d'une odeur particulières, auquel ils donnèrent le nom d'*Apiol,* et qu'ils reconnurent bien vite comme le principe exclusivement antipériodique de cette semence.

Pour obtenir l'apiol, ces auteurs épuisaient les graines de persil pulvérisées par de l'alcool à 70-80°. La liqueur alcoolique, traitée par le charbon animal lavé, était distillée aux trois quarts, au bain-marie. Le résidu était épuisé à son tour par l'éther ou le chloroforme qu'on récupérait par une deuxième distillation. Ce nouveau résidu était ensuite placé à l'étuve, puis additionné du huitième de son poids de litharge. Après repos de quarante-huit heures, on filtrait à travers une légère couche de charbon, et l'apiol s'écoulait pur et incolore.

Joret et Homolle donnaient ensuite les principales réactions physiques et chimiques qu'ils avaient effectuées et concluaient à la découverte d'un nouveau « principe immédiat »; le nom d'apiol qu'ils lui donnaient le plaça dans le groupe des principes analogues qu'ils avaient extraits de diverses ombellifères et qu'ils avaient nommés anisol, cariol, cuminol, phéllandrol.

Joret et Homolle étudiaient ensuite rapidement l'action physiologique de ce corps : à la dose de 1 g., il déterminait une excitation cérébrale légère; à la dose de 2 à 4 g., une véritable ivresse avec étourdissement, titubation, vertiges, sifflements d'oreille, céphalalgie.

Son action thérapeutique sur les fièvres fut longuement étudiée dans de nombreuses observations faites en France et aux colonies.

A partir de cette époque, l'apiol, tel qu'il était défini par Joret et Homolle, fut utilisé et l'est encore en thérapeutique, sous trois formes différentes :

— L'apiol vert;

— L'apiol jaune;

— L'apiol blanc.

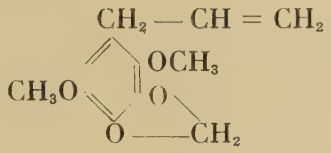
Ces trois formes diffèrent par leur constitution, mais leur préparation est similaire.

L'apiol est préparé par lixiviation alcoolique de la semence de persil; l'huile obtenue après évaporation de l'alcool (et qui constitue l'apiol brut) est passée en glacière. Un produit mal défini, plus ou moins cristallisé, constituant le « beurre d'apiol », se sépare; on essore pour le séparer de l'apiol liquide; ce dernier, après cette première purification physique, est repris par le benzène : les gommes, sucres et autres matières insolubles sont ainsi éliminées. Le résidu est purifié à nouveau par solubilisation dans l'éther. Le nouveau résidu, concentré et débarrassé de toute trace d'éther par évaporation sous vide, constitue l'*apiol vert* du commerce; sa densité est de 1,090. L'*apiol jaune* est le même apiol mais débarrassé de la chlorophylle; il a une densité d'environ 1,100

Enfin, l'*apiol blanc* est obtenu par rectification sous vide; sa densité est d'environ 1,150 à 1,200.

Quelques années après la découverte de l'apiol liquide par Joret et Homolle, le principe actif de cet extrait était isolé en 1877, par Von Gerichten, sous la forme d'un corps cristallisé : ce corps, qui avait été déjà signalé par Dehne puis par Runge sous le nom de camphre de persil, fut appelé par Von Gerichten *apiol cristallisé,* et fut reconnu être le principe actif de l'apiol liquide de Joret et Homolle.

C'est l'éther méthylénique et diméthylique du tétraoxy-allylbenzène de formule :



Il fut alors inscrit à la Pharmacopée française en 1908, et utilisé dans les mêmes buts thérapeutiques que l'apiol liquide de Joret et Homolle.

L'apiol cristallisé du Codex, de 1908, extrait plus particulièrement des semences de persil cultivées en Allemagne (qui en contiennent beaucoup plus), devait posséder les caractéristiques suivantes :

« Aiguilles incolores, à faible odeur de persil, de densité d = 1,015. Il fond à 30°, et après refroidissement reste longtemps surfondu; il bout à 294° et distille sans résidu.

« A peu près insoluble dans l'eau, il se dissout à froid dans l'alcool, l'éther et les huiles grasses.

« Il est inactif sur la lumière polarisée.

« Les solutions sont sans action sur la teinture de tournesol.

« Chauffé doucement avec l'acide sulfurique concentré, il se dissout et la liqueur prend une coloration rouge pourpre caractéristique.

« L'acide azotique l'oxyde à chaud avec formation d'acide oxalique et d'autres produits.

Les alcalis en solution aqueuse sont sans action sur lui, mais en solution alcoolique et après une ébullition très prolongée, ils le transforment en son isomère, l'iso-apiol, composé propénylique correspondant, insoluble dans l'eau, cristallisant en grandes tables quadratiques et fusible à 56°. »

L'apiol cristallisé, seul inscrit au Codex, fut utilisé concurremment à l'apiol liquide de Joret et Homolle. Mais de nombreux accidents hématuriques furent signalés à la suite

d'ingestion de capsules d'apiol. L'examen effectué par Chevalier permit de mettre en évidence dans leur contenu la présence *d'apioside,* hétéroside toxique trouvé à côté de l'apiol dans les semences de persil.

On pouvait pourtant croire que l'inscription au Codex de l'apiol cristallisé mettait les malades à l'abri d'accidents de cette nature, or il n'en était rien. La raison en était la suivante : l'apiol cristallisé, possédant les propriétés exigées par le Codex de 1908, était surtout un produit de laboratoire que la rareté de la matière première (persil allemand) ne permettait pas de trouver régulièrement en droguerie; c'est pourquoi, pour fournir un produit solide, donnant à l'œil l'illusion de l'apiol cristallisé, la fraude lui substituait souvent le « beurre de persil » : ce pseudo-apiol cristallisé contenant de l'apioside serait pour Chevalier la cause des accidents signalés.

C'est pourquoi, étant donné :

— la rareté de la matière première (persil allemand) pour fabriquer l'apiol cristallisé;

— l'analogie des propriétés pharmacodynamiques des divers corps qui entrent dans la constitution des apiols liquides;

— l'emploi thérapeutique, fait essentiellement sous forme d'apiols liquides,

Patein, Brissemoret et Chevalier présentèrent à la Société Thérapeutique, en décembre 1909, un rapport où ils demandaient que l'apiol cristallisé fût supprimé du Codex et remplacé par des apiols liquides dont les caractères seraient suffisamment fixés pour donner toutes garanties thérapeutiques aux médecins.

Malgré l'adoption de ce rapport par la Société Thérapeutique, la Commission du Codex décida sa suppression en 1920, à la suite de nombreux accidents de nature polynévritique dus à l'utilisation d'apiol liquide ou cristallisé d'origine souvent indéterminée.

Ces accidents dus à l'apiol furent longtemps discutés;

P. Chapelle montra d'une manière très détaillée que ces accidents n'avaient jamais existés avant l'apparition de l'apiol cristallisé au Codex de 1908, lorsqu'on utilisait uniquement des apiols liquides; Tiffeneau, Van Itallie, Harsma Van Esveld étudièrent ces accidents, ils montrèrent qu'ils étaient causés par la présence, dans certains apiols commerciaux, *d'un ester ortho-tricrésylphosphorique* ajouté en tant qu'agent falsificateur vu son prix très modéré. En effet, les accidents polynévritiques étaient cliniquement identiques à ceux, connus depuis longtemps, occasionnés par le phosphate de créosote, ainsi qu'à ceux observés aux Etats-Unis après absorption d'extrait de gingembre falsifiés avec du phosphate de triorthocrésyle.

Cette falsification étant facile à déceler, et l'apiol donnant d'excellents résultats en thérapeutique, *l'apiol liquide* fut inscrit à la Pharmacopée française (Codex 1937).

Cet apiol, défini par le Codex comme un extrait alcoolique obtenu avec les semences de Persil, fait donc partie de la Pharmacie galénique.

Les caractéristiques et les essais en étaient les suivants :

« Caractères. — L'apiol est un liquide huileux, coloré en jaune ou jaune verdâtre ou même en vert. Il est complètement soluble dans l'alcool à 95° et dans l'éther. Sa densité, à 15°, est 1,125 à 1,135.

« Point d'ébullition sous une pression de 30 mm. de mercure : 170° à 173°.

« Versez dans un tube à essai 1 cm³ d'apiol et ajoutez avec précaution, goutte à goutte, un mélange à parties égales d'acide sulfurique officinal et d'acide azotique officinal : il se produira une réaction violente et instantanée avec dégagement de vapeurs nitreuses; la masse se colorera en brun. L'apiol mélangé d'huiles étrangères ne donne pas instantanément la réaction violente observée avec l'apiol pur.

« Essais. — 1° L'apiol doit présenter les caractères ci-dessus;

« 2° Mélangez 5 cm³ d'apiol avec 5 cm³ d'éther : la solution devra être complète *(beurre de persil)*;

« 3° Déterminez l'indice de saponification : celui-ci ne devra pas être supérieur à 30 *(huiles étrangères)*;

« 4° Dissolvez 2 cm³ d'apiol dans 2 cm³ d'alcool; ajoutez 2 cm³ de solution alcoolique normale de potasse; portez au bain-marie, de façon à éliminer l'alcool; laissez refroidir; ajoutez 2 cm³ d'eau; ajoutez au mélange quelques gouttes d'acide sulfurique : il ne devra pas se dégager d'odeur de crésol. En outre, la solution étant filtrée, recherchez dans le filtrat le crésol par la solution d'azotate mercurique : il ne devra pas se produire de coloration jaune ou rouge *(phosphate de crésyle)*.

« La recherche du phosphore n'est pas spécifique de la présence des phosphates de crésyle, car l'apiol contient naturellement des principes phosphorés. »

Malgré toutes les garanties que donnait le Codex 1937, l'édition du Codex 1951 supprimait l'apiol.

Actuellement, il est rarement employé comme fébrifuge; il l'est surtout comme agent congestif sur les organes génitaux : il possède en effet une réputation d'emménagogue et est utilisé dans la dysménorrhée et l'aménorrhée, à la dose de 0,25 g. à 0,75 g. par jour, à doses fractionnées; aux doses de 7 à 8 g., il est *abortif*, mais cette action s'accompagne de phénomènes toxiques : hépatonéphrite et hémorragies de sièges variés. Cette dernière action donne à l'apiol une grande importance en toxicologie. Sa recherche dans les liquides biologiques et dans les viscères n'a pas permis jusqu'à présent son identification absolue, c'est pourquoi nous avons repris ce travail.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans les chapitres suivants.

CHAPITRE II

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'APIOL ET DE L'APIOSIDE

I. — ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'APIOL

Nous avons opéré sur des capsules d'apiol jaune liquide des Docteurs JORET et HOMOLLE, conforme au Codex de 1937.

ESSAIS PRÉLIMINAIRES. — ETUDE DES RÉVÉLATEURS

Avant d'entreprendre l'étude chromatographique, il fallait être sûr de pouvoir révéler le spot. Une étude préliminaire fut effectuée sur des bandes de papier Whatman n° 4 imprégnées d'une goutte de solution alcoolique de titre connu en apiol.

Le but cherché pour révéler la tache fut double :

a) Utiliser un réactif général non spécifique, mais très sensible;

b) Appliquer une des réactions classiques de l'apiol aussi spécifique que possible.

A. — *Révélateurs généraux*

a) *Nitrate d'argent ammoniacal ou neutre.* — Utilisé à divers titres et à diverses températures : il ne donne lieu à aucune réduction.

b) *Nitrate mercureux.* — Ionesco, Matiu et Popesco avaient remarqué qu'une solution de nitrate mercureux était réduite par l'apiol à l'état de mercure métallique; ce réactif, non encore utilisé en chromatographie, met en évidence, à froid, une tache de mercure réduit. Une solution aqueuse de ce sel à 1 p. 100 est donc un excellent révélateur; il est cependant peu sensible.

c) *Permanganate de potassium.* — Non encore employé en chromatographie, nous l'avons utilisé en solution normale ou décinormale en différents milieux :

— Milieu alcalin : ne convient pas, le papier verdit par formation de manganate;

— Milieu acide : les taches d'apiol apparaissent à froid, d'abord jaune, puis brun foncé; la coloration est instable dans le temps;

— Milieu neutre : même résultat qu'en milieu acide, mais ici la tache brun foncé reste stable.

Ce révélateur s'est montré le plus sensible, c'est lui que nous avons utilisé dans les études préliminaires.

B. — *Réactifs classiques de l'apiol*

Les réactions précédentes, pour aussi sensibles qu'elles soient, ne résolvent pas le problème de la détection spécifique du spot d'apiol lorsque ce dernier est chromatographié dans un mélange; c'est la raison pour laquelle nous avons essayé d'adapter à chaque spot les réactions classiques dites spécifiques de l'apiol.

a) *Réaction de Jorissen.* — Si, à une solution alcoolique d'apiol on ajoute de l'eau chlorée jusqu'à trouble persistant, puis quelques gouttes d'ammoniaque, le mélange prend une coloration rouge brique fugace.

Nous avons essayé d'appliquer cette réaction à la tache chromatographique.

Technique. — Déposer une goutte d'eau sur le spot (*), promener le papier sur l'ouverture d'un tube à essai générateur de chlore; quand une coloration jaune apparaît, mettre le papier au contact de vapeurs d'ammoniac : la coloration jaune vire au rouge caractéristique de la présence d'apiol. La teinte obtenue est stable pendant une dizaine de minutes.

b) *Réaction de Labat.* — A un millilitre d'une solution alcoolique d'apiol, on ajoute quelques millilitres d'acide sulfurique, puis une à deux gouttes d'une solution alcoolique à 20 p. 100 d'acide gallique; on place le tout au bain-marie bouillant : *une coloration verte* se forme en surface et gagne peu à peu toute la solution.

Du fait de la forte concentration sulfurique, cette réaction ne peut être utilisée directement sur le spot. Nous l'avons appliquée dans les conditions suivantes : placer le petit carré de papier imprégné dans un tube à essai contenant 3 à 4 ml. d'alcool à 95°; laisser en contact pendant quelques minutes, en agitant de temps en temps : l'alcool élue l'apiol; enlever le papier et évaporer la solution alcoolique. Effectuer sur le résidu la réaction de Labat.

C. — *Sensibilité des révélateurs*

Elle est très variable :

	Apiol en microgr. dans la prise
Réactif au nitrate mercureux	500
Réactif de Jorissen	100 à 150
Réactif de Labat	25 à 40
Permanganate de potassium N ou 0,1 N en milieu neutre	1 à 5

(*) Le spot ne doit pas être mis directement en contact avec les vapeurs d'ammoniac, car un nouveau contact avec ces vapeurs après imprégnation au chlore ne fera pas apparaître la coloration. Quand la tache rouge obtenue disparaît, une nouvelle imprégnation ne la fera pas réapparaître.

Technique chromatographique

Etant maintenant en mesure de détecter aussi spécifiquement que possible le spot d'apiol, nous avons utilisé la chromatographie ascendante sur papier anglais Whatman n° 4 (importé d'Angleterre), selon la méthode de Williams et Kirby; nous avons opéré selon la technique classique, à la température de 18° centigrades.

Solvants utilisés :

Nous avons d'abord employé des solvants simples, puis des mélanges de solvants réalisés de manière à obtenir des Rf compris entre 0 et 1, ce qui nous permettra par la suite d'isoler l'apiol d'une manière absolue.

Les résultats obtenus sont réunis dans les tableaux suivants. Seuls les solvants en italique donnent des spots bien délimités; les autres donnant des taches trop étendues (traînée ou élongation) ne peuvent être utilisés en pratique.

Solvants simples :

Rf = 0 : *eau, eau saturée de butanol, eau saturée de phénol;*

Rf = 1 : alcool éthylique, *alcool propylique,* alcool butylique, *alcool butylique saturé d'eau,* alcool benzylique, *alcool amylique,* acétone, benzène, chloroforme, chloroforme saturé d'eau, cyclohexane, dioxane, *eucalyptol,* pyridine, sulfure de carbone, tétrachlorure de carbone, acide acétique;

Rf = 0,86 : *alcool méthylique.*

Donc seul l'alcool méthylique est à retenir.

Solvants mixtes. — Nous avons étudié des mélanges faciles à obtenir :

a) Mélanges binaires (exprimés en volume) :

1° Alcool méthylique-eau :

	Rf
Alcool méthylique à 5, 20, 25, 30 p. 100	0
— — à 50 p. 100	0,60 - 0,64
— — à 55 p. 100	0,62 - 0,66
— — à 60 p. 100	0,88
— — à 70 p. 100	0,94
— — à 80 p. 100	*0,90*

2° Alcool propylique-eau. Nous avons utilisé des mélanges entièrement miscibles :

Alcool propylique à 50, 75 et 90 p. 100, Rf = 1.

3° Acide acétique-eau :

	Rf
Acide acétique à 10, 20, 30 et 40 p. 100.....	0
— — à 50 p. 100	*0,95*
— — à 60 p. 100	0,90
— — à 70, 80 et 90 p. 100	1 »

b) Mélanges ternaires :

1° Eau - alcool méthylique - acide acétique :

Eau	Alcool méthylique	Acide acétique	Rf
20	70	10	0,98
40	50	10	0,96
40	40	20	0,97
40	30	30	0,99
50	20	30	0,93
50	10	40	0,95
50	5	45	0,96
50	2	48	*0,90*
55	22,5	22,5	0,94
55	20	25	0,94

2° Eau - alcool butylique - acide acétique :

Tous les mélanges étudiés sont entièrement miscibles, sauf le mélange eau - alcool butylique - acide acétique : 65 - 22,5 - 12,5 dont nous avons utilisé la phase inférieure.

Eau	Alcool méthylique	Acide acétique	Rf
30	40	30	1
40	30	30	1
50	25	25	1
50	35	15	1
60	20	20	1
60	18	22	1
60	15	25	0,88 - 0,91
60	10	30	0,98
65	20	15	1
65	21	14	*0,32*
65	22,5	12,5	*0,17*
70	15	15	
70	16	14	
70	17,5	12,5	spots très imprécis.
70	20	10	
70	25	5	

Observations. — Il ressort de cette étude que certains solvants ou mélanges de solvants permettent d'obtenir des spots bien délimités, à Rf compris entre 0 et 1, utilisables par la suite pour une caractérisation chromatographique de l'apiol. Ces solvants sont les suivants :

	Rf
Alcool méthylique	0,86
Alcool méthylique à 80 p. 100	0,90
Acide acétique à 50 p. 100	0,95
Eau - alcool butylique - acide acétique : 65 - 21 - 14.	0,32
Eau - alcool butylique - acide acétique : 65 - 22,5 12,5 (phase inférieure)	0,17
Eau - alcool butylique - acide acétique : 60 - 10 - 30.	0,98

Applications. — Nous avons déterminé les Rf des quelques produits se rapprochant de l'apiol par la présence de la fonction dioxyméthylénique, que l'on peut rencontrer au cours d'une expertise toxicologique : narcotine, héliotropine, berbérine, stypticine (chlorhydrate de cotarnine) ; ces produits donnent eux aussi la réaction de LABAT.

Nous les avons chromatographiés *à l'aide des solvants choisis pour l'apiol,* et nous avons révélé les spots par notre technique au permanganate de potassium 0,1 N (sauf pour les spots de berbérine qui sont visibles grâce à leur coloration jaune). Les résultats obtenus sont les suivants :

SOLVANTS	Rf				
	Stypticine	Narcotine	Berberine	Héliotropine	Apiol
Alcool méthylique	0,71	0,85	0,38	0,38	0,86
Eau - alcool butylique - acide acétique 65 - 21 - 14	0,92	0,93	0,94	0,98	0,32
Eau - alcool butylique - acide acétique 65 - 22,5 - 12,5 (phase infér[e]).	1	1	0,96	0,95	0,17
Acide acétique à 50 p. 100	1	0,97	0,77	0,91	0,95

Il ressort de ce tableau que l'apiol peut être isolé et identifié d'une manière absolue, sans confusion possible, en utilisant le mélange des solvants : eau - alcool butylique n. - acide acétique dans deux proportions :

65 - 21 - 14

62,5 - 22,5 - 12,5 (phase inférieure).

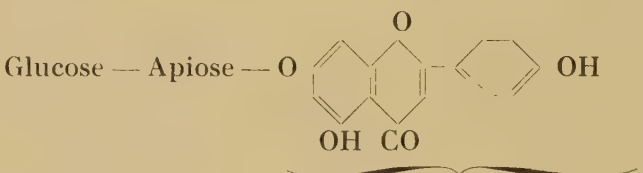
Conclusions. — De cette étude, il découle que l'apiol peut être soumis très aisément à la technique chromatographique, dans les conditions que nous venons de préciser. Sur le spot ainsi obtenu, on peut effectuer les réactions classiques dont nous avons mis au point les conditions opératoires. Nous pouvons dire que la positivité de l'en-

semble de ces réactions sur un spot à Rf spécifique, pour un solvant défini, permet d'affirmer la présence d'apiol.

II. — ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'APIOSIDE

Lorsqu'on prépare l'apiol à partir des semences de persil (*Petroselinum sativum* Hoff.), un des corps que l'on doit éliminer est un hétéroside toxique à l'origine des hématuries : l'*apiine* ou *apioside*. Rappelons-en rapidement la nature et les propriétés.

Constituant chimique des semences de persil, et plus particulièrement du persil allemand, l'apioside est un composé phénolique du groupe des oxyflavonosides, contenant un noyau phénylbenzo-pyrone (ou flavone) et trois radicaux phénoliques dont un uni à deux molécules de sucre : apiose et glucose :



Trihydroxyflavone 5 - 7 - 4'

Sa formule brute est : $C_{26}H_{28}O_{14}$.

Propriétés physiques. — C'est un corps solide peu soluble dans l'eau froide, très soluble dans l'alcool dilué, l'eau bouillante, insoluble dans l'éther, le chloroforme, le sulfure de carbone.

Propriétés chimiques. — Les solutions aqueuses ne réduisent pas la liqueur de Fehling. Traité par l'émulsine ou les acides dilués, il s'hydrolyse suivant deux étapes :

a) $C_{26}H_{28}O_{14} + H_2O \rightarrow \underset{\text{Apiose}}{C_5H_{10}O_5} + \underset{\text{Gluco-apigénine}}{C_{21}H_{20}O_{10}}$

b) $C_{21}H_{20}O_{10} + H_2O \rightarrow \underset{\text{Glucose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Apigénine}}{C_{15}H_{10}O_5}$

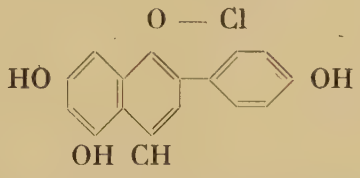
Réactions chimiques. — *a)* Une solution aqueuse d'apioside donne :

— au contact d'une solution de chlorure ferrique, une coloration rouge brun;

— au contact d'une solution de sulfate ferreux, une coloration rouge;

— au contact de solutions alcalines, une coloration jaune.

b) Action des réducteurs. — Sous l'influence de certains agents réducteurs, tels que le trichlorure de titane, l'apioside donne naissance à une coloration variant du rouge au violet-rouge par suite de la formation d'anthocyanidine (cette réaction s'effectue naturellement chez la plupart des végétaux ou dans des cas pathologiques), de formule :

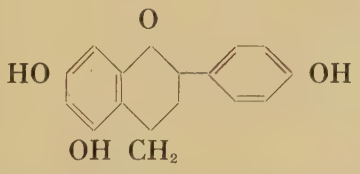


Cette anthocyanidine donne des réactions colorées :

— avec le chlorure ferrique, une coloration brun-jaune intense;

— avec une solution alcaline, une coloration rouge carmin bleutée.

Si la réduction est plus poussée, on peut obtenir un dérivé appartenant aux catéchines :



La recherche de l'apioside dans l'apiol du Codex 1937 est simple quand il s'y trouve à des doses relativement fortes; on le recherche par les deux réactions suivantes :

— coloration rouge brun par le chlorure ferrique;

— coloration rouge par le sulfate ferreux.

Toutefois, de faibles doses ne peuvent être décelées à l'aide de ces réactions; c'est pourquoi nous avons pensé étudier cet hétéroside par la méthode chromatographique, cette étude n'ayant pas fait l'objet, à notre connaissance, de travaux antérieurs, nous permettra :

a) De différencier cet hétéroside de l'apiol « constituant principal » de l'apiol du Codex 1937;

b) De le caractériser, grâce à un Rf bien déterminé, à l'aide d'un réactif sensible.

Notre étude comporte deux parties :

Etude des révélateurs;

Etude des différents solvants en vue d'établir les Rf.

Nous avons utilisé de l'apioside envoyée par le Professeur W. Ollis (Department of organic Chemistry, the University, Bristol S.) (*), préparée selon la technique de Von Gerichten. La solution étalon utilisée contenait 50 mg. (dissous au bain-marie) dans 5 ml. d'alcool à 45°. Cette solution refroidie se prenant très rapidement en masse, il était nécessaire de la chauffer au bain-marie avant son utilisation. Le titre de la solution obtenue était de 0,1 p. 100.

Etude des révélateurs

La technique utilisée est identique à celle employée lors de notre étude chromatographique sur l'apiol; les résultats obtenus sont les suivants :

Solution à 1 p. 100 de chlorure ferrique	Coloration brun foncé.
Solution à 2 p. 100 de sulfate de Fe II ammoniacal.....	Coloration très légèrement jaune pâle.
Acide sulfurique pur	Coloration jaune intense (papier non conservé).
Acide sulfurique à 10 p. 100.	Coloration jaune intense.

(*) Qu'il trouve ici l'expression de nos remerciements les plus respectueux.

Ac. chlorhydrique à 10 p. 100	Coloration jaune intense.
Sol. de sulfate de sodium à 10 p. 100	Coloration jaune intense.
Sol. de nitrate de sodium à 10 p. 100	Coloration jaune intense.
Sol. de nitrite de sodium à 10 p. 100	Pas de coloration.
Solution de OHNa à 10 p. 100	Coloration jaune intense.
Ammoniaque	Coloration jaune intense.
Solution de permanganate de potassium 0,1 N	Coloration brune.
Solution de nitrate d'argent à 1 p. 100	Pas de coloration.
Formol du commerce	Rien à froid, coloration jaune à chaud.

Nous avons essayé d'utiliser certains de ces réactifs sous forme de vapeurs, en particulier l'acide chlorhydrique et l'ammoniaque, les spots se colorent très rapidement en jaune intense.

Réaction personnelle. — L'apioside étant un hétéroside phénolique, nous lui avons appliqué une réaction de diazotation.

Technique : sur le spot, ajouter une goutte d'une solution acétique à 2 p. 100 d'acide sulfanilique, puis une goutte d'une solution à 1 p. 100 de nitrite de sodium, chauffer légèrement au-dessus de la flamme éclairante d'un bec Bunsen : il se développe une coloration orangée intense.

Certaines de ces réactions peuvent être utilisées en chromatographie; nous avons dans ce but déterminé leur limite de sensibilité :

Réactifs	Apioside (en mcg.)
Solution de chlorure ferrique à 1 p. 100.....	250
Solution d'acide sulfurique à 10 p. 100	15
Solution d'acide chlorhydrique à 10 p. 100	15

Réactifs	Apioside (en mcg.)
Ammoniaque	10
Réaction de diazotation	40
Solution de nitrate d'urane à 1 p. 100	100

De tous ces révélateurs, le meilleur et le plus sensible est l'ammoniaque employé sous forme de vapeurs et sans chauffage; il suffit de promener le chromatogramme dans des vapeurs d'ammoniac pour révéler les spots d'apioside.

Remarque. — Nous avons recherché si ce corps n'était pas hydrolysé en partie, en essayant de détecter l'un ou les sucres constitutifs : apiose et glucose, par la réaction au phtalate d'aniline (méthode de Partridge) ; le résultat a été négatif.

Etude des différents solvants

Nous avons essayé un certain nombre de solvants purs ou en mélanges, analogues pour la plupart à ceux antérieurement étudiés pour l'apiol. Nous avons suivi la même technique; les quantités d'apioside chromatographiées furent de 20 à 40 microgrammes; les opérations ont été conduites à la température de 18° centigrades. Les résultats obtenus sont réunis dans les tableaux ci-après; seuls les solvants en italique donnent des spots bien délimités.

Solvants simples :

Rf = 0 : *eau,* acétone, alcool éthylique, alcool butylique n., *alcool amylique, alcool benzylique, benzène, chloroforme, cyclohexane, sulfure de carbone, tétrachlorure de carbone,* eau saturée de phénol, eau saturée d'alcool butylique n.

Rf = 0,38 : alcool méthylique.

Rf = 0,81 : dioxane.

Rf = 0,89 : *acide acétique.*

Rf = 1 : *pyridine,*

Solvants mixtes :

a) Mélanges binaires :

	Rf
Alcool méthylique à 80 p. 100	0,58
Acide acétique à 50 p. 100	0,80
Pyridine - benzène : 10 - 90	*0*
— — 20 - 80	0
— — 50 - 50	1
Acide acétique - benzène : 80 - 20	*1*
— — 50 - 50	*0,12*
— — 20 - 80	*0*
— — 5 - 95	*0*

b) Mélanges ternaires :

Eau - alcool butylique n. - acide acétique : 50 - 2 - 48	*0,84*
Eau - alcool butylique n. - acide acétique : 60-10-30	*0,85*
Eau - alcool butylique n. - acide acétique : 65 - 22,5 12,5 (phase inférieure)	*0,83*
Eau - alcool butylique n. - acide acétique : 65-21-14	*0,83*
Eau - alcool butylique n. - acide acétique : 70-15-15	*0,77*

Il ressort des tableaux précédents que la plupart des solvants étudiés permettent d'obtenir des spots d'apioside nets, bien délimités. Les vapeurs d'ammoniac permettent de déceler 10 microgrammes d'apioside au niveau de ces spots.

III. — APPLICATION GALÉNIQUE A LA DÉTECTION DE L'APIOSIDE DANS L'APIOL OFFICINAL, PAR CHROMATOGRAPHIE.

Nous avons constitué des mélanges d'apiol et d'apioside en différentes proportions que nous avons chromatographiées par les mêmes techniques.

La révélation des spots a été réalisée de la manière suivante : nous mettons le chromatogramme au contact des

vapeurs ammoniacales qui nous indiquent le spot d'apioside; nous marquons ce spot; après avoir chauffé légèrement le chromatogramme pour volatiliser l'ammoniac, nous révélons l'apiol à l'aide de la solution de permanganate de potassium 0,1 N.

Remarque. — Ce dernier réactif révèle aussi l'apioside, il est donc un deuxième moyen d'en contrôler la présence.

Nous avons utilisé des mélanges d'apiol et d'apioside en solution alcoolique dans les proportions que l'on peut retrouver lors d'une analyse d'apiol non purifié.

Apioside (en microgrammes)	20	20	10
Apiol (en microgrammes)	200	250	200

Les résultats obtenus se sont révélés excellents en rapport avec ceux donnés séparément avec l'apiol et l'apioside. Dans chaque expérience, deux spots nettement délimités et distincts l'un de l'autre ont été décelés :

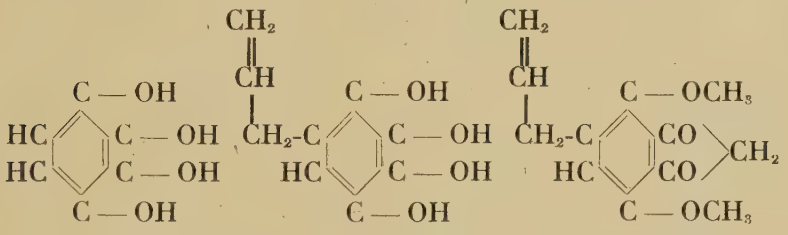
Solvants	Rf			
	Apiol seul	Mélange		Apiine seul
		Apiol	Apios.	
Alcool méthylique	0,86	0,87	0,38	0,38
Alcool méthylique à 80 p. 100	0,90	0,91	0,58	0,58
Eau - alcool butylique n. - acide acétique. (65 - 21 - 14)	0,32	0,32	0,83	0,83
Eau - alcool butylique n. - acide acétique. (65 - 22,5 - 12,5)	0,17	0,18	0,83	0,83
Eau - alcool butylique n. - acide acétique. (60 - 10 - 30)	0,98	0,98	0,86	0,85
Acide acétique à 50 p. 100	0,95	0,95	0,80	0,80

Conclusions. — L'apioside, constituant de l'apiol liquide non totalement purifié peut être séparé de l'apiol par chromatographie, à l'aide de solvants adéquats. Corrélativement, cette méthode permet d'isoler et de déceler des traces de ce produit.

CHAPITRE III

ÉTUDE CHIMIQUE DE L'APIOL

L'apiol est un dérivé du tétraphénol 1-2-3-4, *l'apionol* et plus particulièrement de l'allylapionol; c'est l'éther méthylénique 3-4 et diméthylique 2-5 de l'allylapionol :



Apionol — Allylapionol — Apiol

Ses réactions colorées sont rares et manquent de spécificité :

a) Chauffé doucement avec l'acide sulfurique concentré, il fournit une solution de couleur rouge pourpre;

b) Chauffé au bain-marie bouillant avec de l'acide sulfurique concentré et en présence d'une à deux gouttes de solution alcoolique d'acide gallique, il se développe une coloration verte; cette réaction, découverte par LABAT, est spécifique du groupement dioxyméthylénique.

Nous avons cherché à mettre au point d'autres réactions chimiques en agissant séparément ou simultanément sur :

1° Sa fonction dioxyméthylénique;

2° Ses fonctions oxyméthyliques;

3° Sa chaîne allylique.

I. — ACTION SUR LA FONCTION DIOXYMÉTHYLÉNIQUE — O — CH_2 — O —

1° **Réaction de Labat.** — Elle permet de caractériser cette fonction, elle est très sensible et facile à effectuer; cependant, on sait qu'elle n'est pas spécifique. Nous avons mis au point deux procédés de dosage de l'apiol, basés sur cette réaction :

a) Procédé basé sur la recherche de la limite de la sensibilité de la réaction;

b) Procédé colorimétrique avec établissement d'une courbe étalon.

A. — *Recherche de la limite de sensibilité de la réaction de Labat*

Dans un tube à essai, placer une quantité déterminée d'apiol, 2 ml. d'acide sulfurique concentré, agiter; ajouter, à l'aide d'une pipette, à la surface de l'acide, une à deux gouttes de solution alcoolique d'acide gallique à 20 p. 100. Porter le tube au bain-marie bouillant pendant une minute; selon la dose d'apiol mise en jeu, nous observons les faits suivants :

	Apiol (en microgrammes)				
	> 50	30	15	10	5
Apparition, à la surface du liquide, d'un...	Anneau vert qui s'étend peu à peu pour colorer tout le liquide.	Anneau vert qui s'étend peu à peu pour colorer tout le liquide, à condition de continuer à chauffer.	Léger anneau vert qui, agité, teinte *à peine* le liquide.	Anneau vert à peine perceptible qui, agité, ne colore pas le liquide.	Pas de coloration.

Conclusion. — La limite réelle de la sensibilité de la réaction de Labat est de 10 microgrammes dans la prise

d'essai; nous prendrons toutefois comme limite pratique la dose de 15 microgrammes.

Exemple de dosage. — Considérons un résidu d'extraction de l'éther acide contenant de l'apiol; reprenons ce résidu par 0,25 ml. d'alcool, ce volume mesuré à la pipette correspondant à XX gouttes. Recherchons la limite de sensibilité en utilisant la technique précédente; utilisons successivement I, II, III, IV gouttes de solution alcoolique; les résultats obtenus sont par exemple les suivants :

	Solution alcoolique d'apiol (en gouttes)			
	I	II	III	IV
Réaction...	Négative	Négative	Positive : anneau vert qui, agité, teinte en vert pâle le liquide.	Nettement positive.

Il ressort de cette expérience que III gouttes de solution alcoolique contiennent 15 microgrammes d'apiol.

La quantité totale d'apiol sera égale à :

$$\frac{15 \times 20}{3} = 100 \text{ microgrammes dans le résidu.}$$

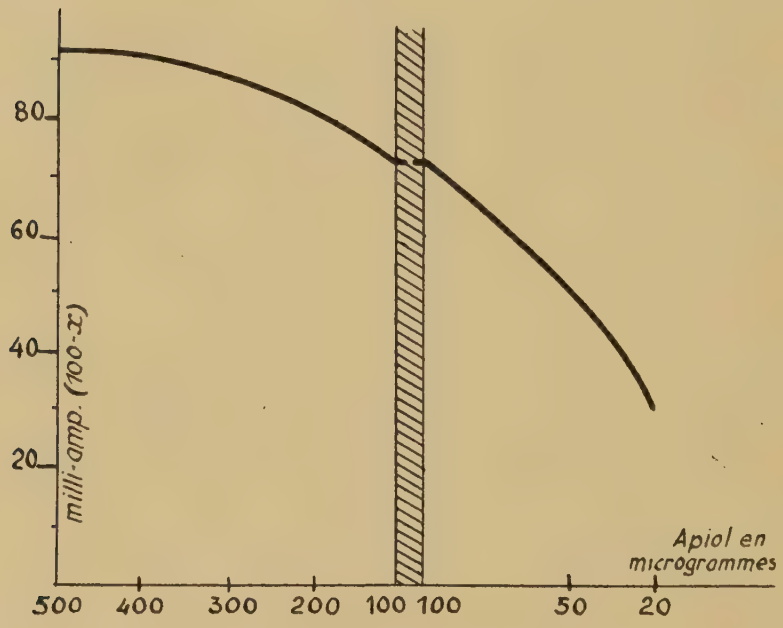
B. — *Procédé colorimétrique*

Si la méthode précédente convient pour les très faibles doses d'apiol, elle entraîne à des erreurs pour les doses plus importantes; c'est la raison pour laquelle nous avons adapté la réaction à un dosage colorimétrique et établi une courbe étalon de référence.

Etablissement de la courbe étalon. — Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule photo-électrique munie d'un écran orangé; la technique utilisée est la suivante : dans un tube à essai, placer 7 ml. d'acide sulfurique pur, une quantité déterminée d'apiol, II gouttes de solution alcoolique d'acide gallique à 20 p. 100; placer le tube au bain-

marie bouillant pendant deux minutes, agiter et passer à la cellule.

Les quantités d'apiol utilisées ont varié de 20 à 500 microgrammes. La courbe établie (fig. 1) donne les variations d'intensité obtenues en fonction des déviations du milliampèremètre (100 - x trouvé) ; cette courbe montre que la



Courbe d'étalonnage avec la réaction de Labat.

dose maximum mesurable, compatible avec cette technique, est inférieure à 500 microgrammes; la valeur minimum facilement dosable est 20 microgrammes. La meilleure bande de lecture est comprise entre 20 et 300 microgrammes.

2° **Saponification ou hydrolyse :**

a) Les alcalis en solution alcoolique saponifient plus facilement le groupement dioxyméthylénique que le groupement oxyméthylique; cependant, la technique employée

est relativement complexe : la littérature indique qu'il faut une température de 180° pendant quatre à cinq heures. L'avantage de cette réaction est qu'elle ne touche pas les groupements oxyméthyliques ni la chaîne allylique.

b) L'acide iodhydrique peut aussi être utilisé, mais il touche aussi les fonctions oxyméthyliques.

c) Le pentachlorure de phosphore, le chlorure de thionyle, le bisulfite de sodium, le chlorure d'aluminium sont aussi des agents d'hydrolyse, mais l'application de chacun d'eux nécessite des conditions trop complexes pour entrer dans le cadre de la toxicologie.

d) Les acides minéraux étendus hydrolysent facilement cette fonction; l'hydrolyse complète nécessite une durée de chauffage d'environ cinq heures.

II. — ACTION SUR LES FONCTIONS OXYMÉTHYLIQUES

L'acide iodhydrique peut les hydrolyser, mais les conditions opératoires sont incompatibles avec une technique toxicologique.

III. — ACTION SUR LA CHAINE ALLYLIQUE

a) On peut d'abord caractériser la double liaison par le réactif de Denigès au sulfate de mercure en solution acide.

b) On peut aussi transformer la chaîne allylique en chaîne propylénique puis créer une fonction aldéhyde par oxydation :

$$CH_2 - CH = CH_2 \rightarrow CH \overset{\text{OH}}{=} CH - CH_3 \rightarrow CHO$$

+ alcalis + O formation d'aldéhyde apiolique

Il ressort de cette étude que nous pouvons, dans le cadre toxicologique, utiliser pratiquement deux réactions :

1° L'hydrolyse de la chaîne dioxyméthylénique;

2° La transformation de l'apiol en aldéhyde apiolique.

1° *Etude de l'hydrolyse de la chaîne dioxyméthylénique*

a) Par la potasse alcoolique. — Nous avons opéré de la manière suivante : dans un ballon de 150 ml. muni d'un réfrigérant ascendant, placer 2 dg. d'apiol, 50 ml. de potasse alcoolique à 5 p. 100, chauffer pendant un certain temps : 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 5 heures, 6 heures. Refroidir, neutraliser par ClH N jusqu'à légère acidité; noyer par trois fois le volume d'eau distillée, épuiser dans une ampoule à décantation, par l'éther de pétrole puis par l'éther sulfurique. Sur le résidu d'évaporation de ce dernier, contrôler la positivité ou la négativité de la fonction dioxyméthylénique par la réaction de Labat.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps d'hydrolyse	Réaction de Labat
1 heure	+ + + +
2 heures	+ + + +
3 heures	+ + + +
4 heures	+ +
5 heures	+
6 heures	0

Il ressort de cette étude que la fonction dioxyméthylénique peut être entièrement hydrolysée par la potasse alcoolique à la température de 100° au bout de six heures.

b) Par les acides étendus. — Nous avons utilisé *l'acide chlorhydrique étendu au 1/10e en volume.*

Technique : dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant, placer 2 dg. d'apiol, 20 ml. d'acide chlorhydrique au 1/10e, chauffer pendant un temps déterminé : 4 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 5 heures, 6 heures. Refroidir; épuiser dans une ampoule à décantation, par l'éther de pétrole puis l'éther sulfurique; sur le résidu d'évaporation de ce dernier, contrôler comme précé-

demment, la présence ou l'absence d'apiol, à l'aide du réactif de Labat.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps d'hydrolyse	Réaction de Labat
4 minutes	+ + + + +
30 minutes	+ + + +
1 heure	∓ + + +
2 heures	+ + + +
3 heures	+ + + +
4 heures	+ + + +
5 heures	à peine positive
6 heures	0

Il résulte de ces expériences que la fonction dioxyméthylénique est hydrolysée intégralement par l'acide chlorhydrique au 1/10e, à la température de 100°, au bout de six heures.

2° *Transformation de l'apiol en aldéhyde apiolique*

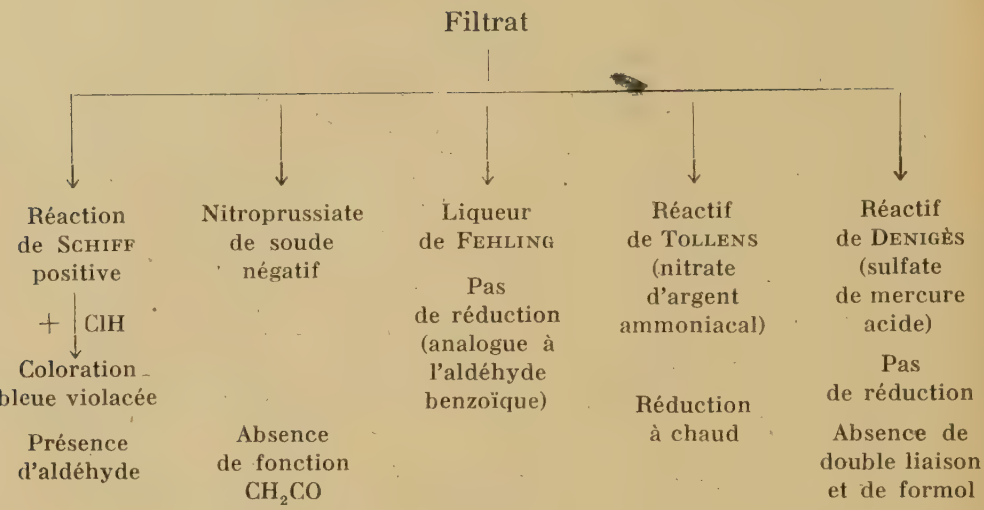
Nous avons appliqué à l'apiol la technique de Polek : dans un erlenmeyer, placer quelques dg. d'apiol, ajouter 40 ml. de solution 0,1 N de MnO_4K, 10 ml. de solution N de OHNa, faire bouillir quinze minutes, filtrer, neutraliser le filtrat par l'acide acétique. Sur la solution obtenue, nous recherchons la présence d'aldéhyde et l'absence de double liaison.

Le tableau suivant (voir page 32) résume les réactions utilisées.

Ces réactions permettent d'affirmer la présence d'aldéhyde aromatique; donc, dans les conditions expérimentales mises en jeu, nous pouvons affirmer qu'il y a eu formation d'aldéhyde apiolique.

La positivité de la réaction de Labat montre que, dans ces conditions, le groupement dioxyméthylénique n'a pas été hydrolysé.

D'autre part, nous avons utilisé la réaction colorée que



donne le réactif hydrostrychnique avec certains adhéhydes : 2 ml. de filtrat additionné de 3 ml. d'eau et de 2 ml. de réactif hydrostrychnique donne au bain-marie bouillant une coloration verte après trois heures.

Variante de la technique de Polek. — Nous avons changé les conditions opératoires de cette technique :

a) Nous avons remplacé MnO_4K 0,1 N par MnO_4K N, la coloration, à l'aide du réactif hydrostrychnique, apparaît au bout de deux heures de bain-marie bouillant;

b) Si nous augmentons le temps de chauffage de l'opération, soit une heure, le rendement est meilleur.

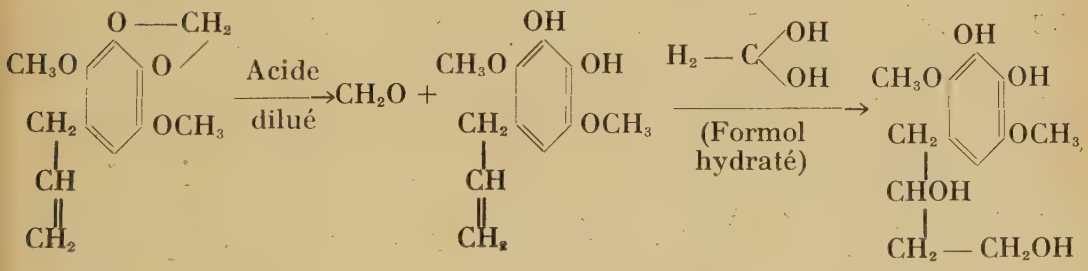
En résumé, l'apiol traité par du MnO_4K N puis par NaOH N pendant une heure, à 100°, est transformé en aldéhyde apiolique que l'on peut facilement détecter à l'aide du réactif hydrostrychnique.

IV. — ACTION SIMULTANÉE SUR LA CHAINE ALLYLIQUE ET LE GROUPEMENT DIOXYMÉTHYLÉNIQUE

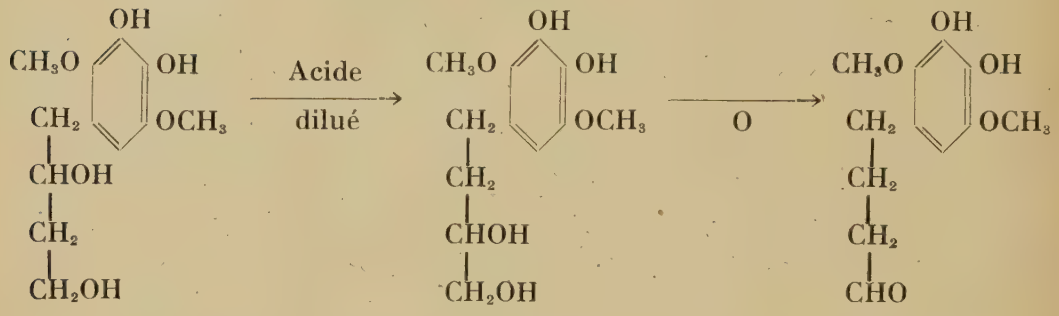
La littérature mentionne que les corps possédant une fonction dioxyméthylénique peuvent, sous l'influence des acides, donner naissance à du formol. Nous avons appliqué cette réaction à l'apiol, et nous avons utilisé, pour caractériser le formol dégagé, la coloration bleue que ce dernier donne au bain-marie bouillant avec le réactif hydrostrychnique.

Nous avons opéré de la manière suivante : dans un gros tube à essai surmonté d'un déflegmateur, nous plaçons : 10 mg. d'apiol, 5 ml. d'eau, 2 ml. de réactif hydrostrychnique, le tout est porté au bain-marie; au bout de six heures, nous notons l'apparition d'une coloration *verte*, or le formol doit donner une coloration bleue. La formation de cette coloration peut s'expliquer ainsi :

Sous l'influence de l'acidité du réactif (équivalent pour la réaction à une acidité de 1/7e), le formol se dégage et vient se fixer sur la double liaison de la chaîne allylique :



Sous l'influence de l'acidité et de la chaleur, il y a transposition moléculaire suivie d'une oxydation :

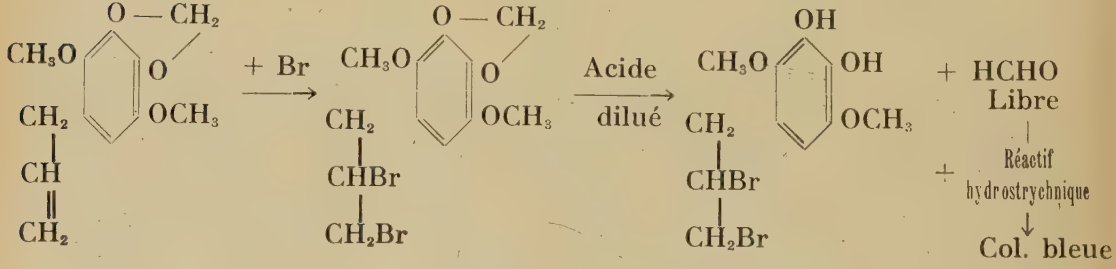


L'aldéhyde formée est responsable de la coloration verte obtenue avec le réactif hydrostrychnique.

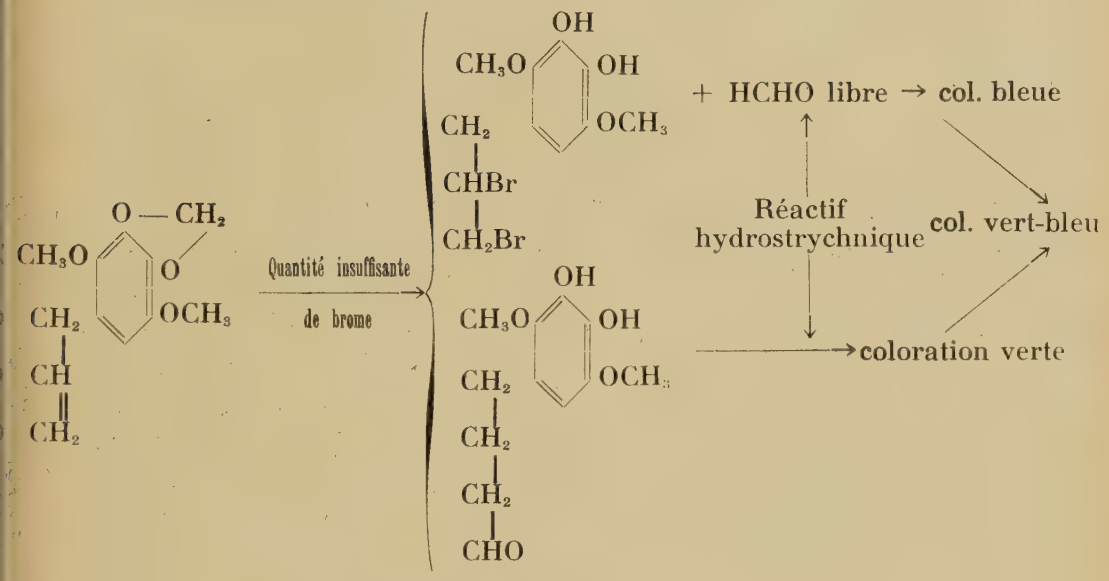
Si nous voulons obtenir une coloration bleue, il faut empêcher le formol de se fixer sur la double liaison; il suffit pour cela de bloquer la double liaison en la saturant par exemple par le brome ou par l'hydrogène naissant.

Saturation par le brome :

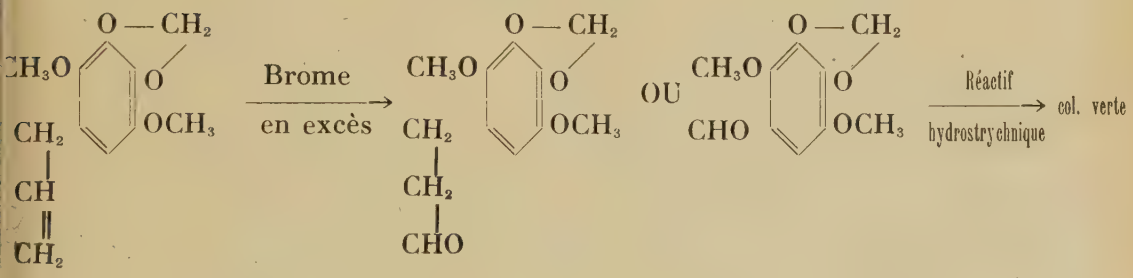
a) Si nous utilisons une quantité de brome exactement suffisante pour la saturation, la coloration bleue prend naissance; le processus est schématisé ci-après :



b) Si nous utilisons une quantité de brome insuffisante pour saturer entièrement la double liaison, il y aura formation d'un mélange d'aldéhyde aromatique et de formol libre qui donneront, au contact du réactif hydrostrychnique, une coloration vert-bleu :

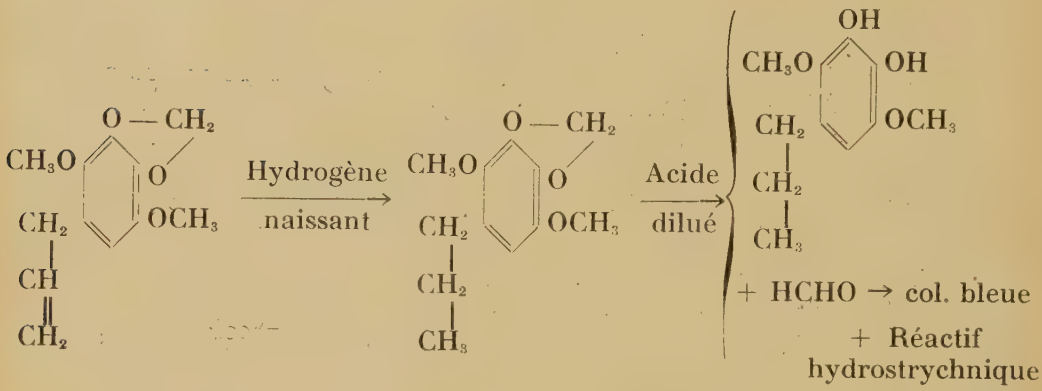


c) Si nous utilisons un excès de brome, ce dernier agira comme oxydant au niveau de la double liaison, avec apparition d'une fonction aldéhydique.



Saturation par l'hydrogène naissant :

En traitant l'apiol par le couple zinc-acide chlorhydrique dilué, on obtient facilement la saturation de la double liaison, et l'apparition de la coloration bleue avec le réactif hydrostrychnique.



Le tableau ci-contre réunit les résultats obtenus en agissant simultanément sur la fonction dioxyméthylénique et la chaîne allylique.

Il ressort de cette étude que l'on peut ainsi facilement détecter la présence d'apiol; ces réactions ne sont pas toutes applicables à la diagnose toxicologique; certaines d'entre elles se révèlent complexes, et les conditions expérimentales sont souvent trop strictes.

C'est pourquoi nous avons choisi celles qui nous paraissent les plus simples à effectuer lors d'une expertise toxicologique; ces techniques, avec leur mode opératoire, sont les suivantes :

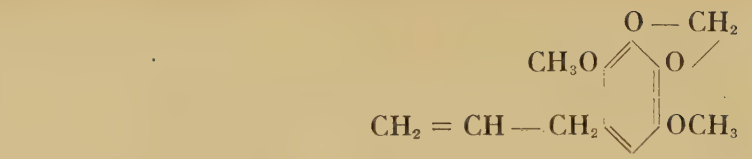
1° Transformation de l'apiol en aldéhyde apiolique, par oxydation en milieu alcalin;

2° Hydrolyse de la fonction dioxyméthylénique, par les acides dilués :

a) Sans saturation de la double liaison de la chaîne allylique;

b) Après saturation de la double liaison par le brome;

Apiol



Acides minéraux dilués a l'ébullition

Libération de formol qui se fixe sur la double liaison de la chaîne allylique :

$— CH_2 — CH = CH_2$

$— CH_2 — CHOH — CH_2 — CH_2OH$

transposition moléculaire

$— CH_2 — CH_2 — CHOH — CH_2OH$

déshydratation

$— CH_2 — CH_2 — CH_2 — CHO$

Réactif hydrostrychnique

Coloration verte

Saturation de la double liaison par le brome

$— CH_2 — CH = CH_2$

$— CH_2 — CHBr — CH_2Br$

acides dilués

Libération de formol

Réactif hydro-strychnique

Coloration bleue

Traitement par le brome en excès

$— CH_2 — CH = CH_2$

ou

$— CHO$

$— CH_2 — CH_2 — CHO$

Réactif hydro-strychnique

Coloration verte

Traitement par quantité insuffisante de brome pour saturer la double liaison.

Mélange d'aldéhydes aromatiques et de formol

Réactif hydro-strychnique

Coloration vert-bleu

Traitement par hydrogène naissant

$— CH_2 — CH — CH_2$

$— CH_2 — CH_2 — CH_3$

acides dilués

Libération de formol

Réactif hydro-strychnique

Coloration bleue

c) Après saturation de la double liaison par l'hydrogène naissant.

La caractérisation de l'aldéhyde formé sera effectuée à l'aide du réactif hydrostrychnique, en raison de sa grande sensibilité.

Modes opératoires. — Toutes ces techniques peuvent être mises en œuvre pour effectuer un dosage colorimétrique :

1° Transformation de l'apiol en aldéhyde apiolique, par oxydation en milieu alcalin :

Le résidu de l'éther acide contenant l'apiol est repris par 2 à 3 ml. d'éther, et placé dans un gros tube muni d'un déflegmateur; ajouter quelques millilitres de MnO_4K N et 1 ml. de NaOH N, faire bouillir une heure, laisser refroidir, filtrer, neutraliser le filtrat par l'acide acétique.

Prélever 5 ml. de filtrat, ajouter 2 ml. de réactif hydrostrychnique, chauffer le tout dans un tube à essai, au bain-marie bouillant; au bout de deux heures, une coloration verte signant la présence d'aldéhyde apparaît.

2° Oxydation de l'apiol par le brome en excès :

Le résidu de l'éther acide contenant l'apiol est repris par 2 ml. d'éther et placé dans un gros tube à essai. Evaporer la solution éthérée et ajouter XXX gouttes d'eau bromée saturée. Chauffer au bain-marie bouillant pendant dix minutes; ajouter 5 ml. d'eau, 2 ml. de réactif hydrostrychnique. Au bout de deux heures, une coloration verte apparaît.

3° Hydrolyse de la fonction dioxyméthylénique par les acides dilués, sans saturation préalable de la double liaison :

Le résidu d'extraction de l'éther acide est repris par 2 ml. d'éther, placé dans un tube à essai et évaporé, ajouter 5 ml. d'eau et 2 ml. de réactif hydrostrychnique, fermer le tube à l'aide d'un bouchon muni d'un déflegmateur, chauffer au bain-marie bouillant; au bout de six heures, une

coloration verte caractéristique de la présence d'aldéhyde apparaît.

4° Hydrolyse de la fonction dioxyméthylénique par les acides dilués après saturation de la double liaison par le brome :

Le résidu d'extraction de l'éther acide est repris par 2 ml. d'éther et placé dans un tube à essai; évaporer au bain-marie, ajouter X gouttes d'eau bromée saturée et évaporer l'excès de brome au bain-marie à peine bouillant (pour éviter une oxydation possible) ; ajouter 5 ml. d'eau, 2 ml. de réactif hydrostrychnique, fermer le tube à l'aide d'un bouchon muni d'un déflegmateur, chauffer au bain-marie bouillant. Au bout de quatre heures, une coloration bleue très nette, caractéristique du formol, apparaît.

5° Hydrolyse de la fonction dioxyméthylénique par les acides dilués après saturation de la double liaison par l'hydrogène naissant :

Le résidu d'extraction de l'éther acide est repris par 2 ml. d'éther et placé dans un tube à essai; évaporer au bain-marie, ajouter 4 ml. d'acide chlorhydrique, 7 ml. de solution de sulfate de strychnine à 1 p. 100, une lamelle de zinc, fermer le tube à l'aide d'un bouchon muni d'un déflegmateur, le placer au bain-marie bouillant; au bout de six heures, il apparaît une coloration bleue caractéristique de la présence de formol.

CHAPITRE IV

ÉTUDE TOXICOLOGIQUE DE L'APIOL

Le but de cette étude est la détection toxicologique dans les viscères d'apiol ingéré.

Protocole expérimental. — Il comprend deux parties :

1° Recherche de l'apiol ajouté en quantité déterminée à un poids connu de pulpe fraîche ou putréfiée d'organes (foie et rein de bœuf). Etude de la chromatographie des résidus d'extraction.

2° Recherche sur des viscères d'animaux (lapins) intoxiqués *per os*. Etude de la chromatographie de certains résidus d'extraction.

Techniques utilisées. — Elles comportent :

1° Les techniques d'extraction;

2° Les techniques de caractérisation et de dosage.

1° **Techniques d'extraction.** — Les viscères et les liquides biologiques (sang, urines, matières fécales) ont été traités par la méthode de FLORENCE modifiée, dans les conditions expérimentales suivantes.

Un poids déterminé de pulpe d'organes (ou de liquide) est additionné du même poids d'acide trichloracétique à 20 p. 100; porter le tout au bain-marie réglé de telle sorte que le mélange soit à 45-50°, pendant une demi-heure; agiter de temps en temps, puis porter à la glacière

une heure (solidification des graisses). Filtrer sur verre fritté placé sur une fiole de BERTRAND en s'aidant du vide; laver le résidu à l'acide trichloracétique à 20 p. 100. Le filtrat obtenu est clair; alcaliniser légèrement par la lessive d'hydroxyde de sodium en présence de papier de tournesol (à la neutralité, le filtrat brunit), puis acidifier par quelques millilitres d'acide acétique.

NOTA. — *Cette alcalinisation suivie d'acidification acétique est de première importance. En effet, le résidu éthéré ultérieur correspondant à l'épuisement du liquide trichloracétique contiendrait cet acide qui entraînerait la caramélisation du résidu. L'acide acétique, au contraire, ne présente pas cet inconvénient.*

Epuiser la solution acide à deux reprises différentes par 20 ml. d'éther de pétrole (pour enlever les graisses), puis à trois reprises par 20 ml. d'éther sulfurique. Recueillir les phases éthérées et agiter le tout avec une petite quantité de sulfate de sodium anhydre afin de le déshydrater. Filtrer sur coton. Evaporer sur une platine chauffante à une température inférieure à 45°.

NOTA. — *Nous avons montré par ailleurs que l'éther sulfurique pur chauffé à une température supérieure à 50° pouvait donner naissance à un composé donnant la réaction de Labat. (Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* 1952, **90,** 118.)

Reprendre le résidu par une petite quantité d'alcool absolu (généralement 0,25 ml.) et pratiquer sur cette solution les essais d'identification, de dosage de l'apiol, ainsi que la chromatographie.

2° **Techniques de caractérisation et de dosage.** — Il suffira ici d'appliquer les techniques exposées dans les deux précédents chapitres : chromatographie et réactions chimiques.

I. — RECHERCHES SUR DES VISCÈRES ARTIFICIELLEMENT ENRICHIS EN APIOL

A. — Viscères frais

Des poids identiques d'organes frais pulpés (50 grammes) ont été additionnés de doses croissantes d'apiol, le tout a été convenablement mélangé; l'apiol est ensuite extrait et dosé dans les différents mélanges. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

Apiol ajouté (en mcg.)	0	50	200	500	1.000
Apiol retrouvé (en mcg.) ..	0	40	190	480	960

Chromatographie du résidu d'extraction. — Le résidu d'extraction doit, à priori, contenir l'apiol souillé par d'autres substances extraites par l'éther acide.

Nous avons d'abord essayé d'identifier la présence de bases aminées, pouvant résulter d'un début de putréfaction. Sur un carré de papier Whatman, un spot enrichi fut constitué à partir de IV à V gouttes de solution alcoolique du résidu d'extraction. La révélation au réactif de Nessler permet de conclure à l'absence de bases aminées.

Pour arriver à déterminer la présence de toute autre substance que l'apiol, nous avons utilisé, dans un deuxième temps, un résidu d'extraction témoin provenant *des mêmes viscères non additionnés d'apiol* et effectué, sur des spots constitués comme précédemment, une révélation au permanganate de potassium.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Premier résidu d'extraction-témoin
(correspondant à 50 g. d'organes et à L gouttes)

Solution alcoolique en gouttes	I	II	III
Permanganate de potassium 0,1 N. .	pas de réduction	légère réduction	nette réduction

Deuxième résidu d'extraction-témoin
(correspondant à 25 g. d'organes et à L gouttes)

Solution alcoolique en gouttes	I	II	III
Permanganate de potassium 0,1 N. .	pas de réduction	pas de réduction	légère réduction

Il résulte de ces expériences que, lorsqu'on chromatographie un résidu d'extraction, selon la quantité d'organes de départ, on peut obtenir soit un spot correspondant à l'apiol, soit deux spots, correspondants à l'apiol et aux substances l'accompagnant.

Chromatographie d'un résidu d'extraction témoin

Le résidu d'extraction provenant de 50 grammes d'organes est repris par 0,25 ml. d'alcool absolu, volume qui correspond à XX gouttes; nous déterminons préalablement le nombre de gouttes nécessaires pour obtenir sur papier une franche réduction par le permanganate de potassium 0,1 N : III gouttes sont nécessaires.

Nous chromatographions ce volume à l'aide des cinq solvants choisis dans un de nos précédents chapitres. Les résultats obtenus sont les suivants :

Solvants	Rf du résidu-témoin
Alcool méthylique	0,78
Alcool méthylique à 80 p. 100	0,76
Acide acétique à 50 p. 100	0,80
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 21 - 14)	0,95
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 22,5 - 12,5) (phase inférieure)	0,72

Tous les spots obtenus sont nets et bien délimités.

Chromatographie d'un résidu d'extraction contenant de l'apiol

Nous avons chromatographié un résidu d'extraction contenant de l'apiol; le volume utilisé est de III gouttes, correspondant à 45 microgrammes d'apiol d'après le dosage

préliminaire. A priori, nous ne savons pas si nous décèlerons un ou deux spots. Voici les résultats obtenus :

Solvants	Rf		Rf type de l'apiol
Alcool méthylique	0,80	*0,92*	0,86
Alcool méthylique à 80 p. 100	»	*0,88*	0,90
Acide acétique à 50 p. 100	»	*0,95*	0,95
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 21 - 14)	0,92	*0,34*	0,32
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 22,5 - 12,5) (phase inférieure)	»	*0,22*	0,17

Nous avons contrôlé par les réactions chimiques que les Rf en italique correspondent à de l'apiol.

Réunissons dans un seul tableau tous les résultats obtenus dans ce chapitre :

Solvants	Rf				
	Résidu d'extraction témoin		Résidu d'extraction contenant de l'apiol		Apiol
Alcool méthylique	0,78	←	0,80	0,92 →	0,86
Alcool méthylique à 80 p. 100	0,76		»	0,88 →	0,90
Acide acétique à 50 p. 100	0,80		»	0,95 →	0,95
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 21 - 14)	0,95	←	0,92	0,34 →	0,32
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 22,5 - 12,5) (phase infér^re^).	0,72		»	0,22 →	0,17

Les Rf attribués à l'apiol sont, d'après ce tableau, très proches des Rf types; il semblerait qu'il y ait un léger entraînement de la part des substances extraites voisines; quoi qu'il en soit, ces Rf sont bien individualisés, ils permettent d'affirmer d'une manière absolue la présence d'apiol.

B. — Viscères putréfiés

Il arrive très souvent que l'on ait à effectuer une expertise toxicologique sur des viscères en état de putréfaction avancée. Il en résulte la formation de bases aminées qui

peuvent venir interférer lors de l'étude chromatographique.

C'est pourquoi nous avons abandonné, dans un récipient recouvert d'une toile de gaze, 50 grammes de pulpe d'organes pendant dix jours, à la température de 15-18°. Au bout de ce temps, nous avons ajouté une quantité déterminée d'apiol; après avoir homogénéisé le mélange, nous avons opéré l'extraction de l'apiol sur la totalité par la méthode habituelle.

Plusieurs témoins de dates différentes (dix jours, quatorze jours, dix-huit jours) ont été traités dans les mêmes conditions, sans addition d'apiol.

Les résidus ont été repris par 0,25 ml. d'alcool absolu; les solutions obtenues présentent une coloration brune plus intense que celles des solutions provenant des résidus d'extraction d'organes frais. D'autre part, la réaction de Nessler, appliquée au spot formé par une goutte de solution, s'est montrée fortement positive et les spots témoins réduisent fortement le permanganate de potassium 0,1 N.

Chromatographie des résidus d'extraction témoins

Trois résidus témoins, provenant d'organes plus ou moins putréfiés (dix jours, quatorze jours, dix-huit jours) ont été chromatographiés. La réaction de Nessler appliquée préalablement sur ces résidus s'est montrée d'autant plus intense que la putréfaction était plus avancée.

Les solvants utilisés sont les mêmes que ceux utilisés dans les chapitres précédents; les spots ont été révélés, soit avec la solution de permanganate de potassium 0,1 N, soit avec le réactif de Nessler. Les résultats sont résumés ci-après.

Solvants	Rf		
	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3
Alcool méthylique	0,78	0,77	0,77
Alcool méthylique à 80 p. 100	0,97	0,97	0,82
	0	0	
Acide acétique à 50 p. 100	0,82	0,80	0,80
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 21 - 14)	1	1	0,98
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 22,5 - 12,5) (phase inférieure)	1	1	0,98

L'examen de ce tableau montre que l'étude chromatographique permet de mettre en évidence un spot bien délimité à Rf défini, décelable par MnO_4K 0,1 N ou par le réactif de Nessler, qui représente *l'ensemble des bases aminées formées lors de la putréfaction des organes.*

La révélation, dans le cas de l'alcool méthylique, pour les témoins 1 et 2 d'un deuxième spot à Rf = 0, montre de plus que ce résidu contient, à côté des bases aminées, d'autres substances réductrices uniquement décelables par MnO_4K 0,1 N.

Chromatographie des résidus d'extraction contenant de l'apiol

Deux extractions ont été réalisées :

— une après addition de 500 microgrammes d'apiol;

— une après addition de 2.000 microgrammes d'apiol.

Les résidus d'extraction, fortement colorés en jaune brun, ont été repris par 0,25 ml. d'alcool absolu; nous avons dosé sur ces résidus les quantités d'apiol extraites :

	A	B
Apiol au départ (en mcg.)	2.000	500
Apiol extrait (en mcg.)	1.950	480

Nous avons chromatographié une goutte de chacune des solutions (une goutte de A correspondant à 58 micro-

grammes d'apiol, une goutte de B à 32 microgrammes). Un essai préalable nous a indiqué que chacune de ces gouttes réduisait fortement MnO_4K 0,1 N et donnait, au contact du réactif de Nessler, une coloration nettement orangée.

A priori, nous devons donc obtenir deux spots : un correspondant à l'apiol, l'autre au groupe des bases aminées. Voyons, pour chacun des solvants, les résultats obtenus.

Solvant : eau - alcool butylique n. - acide acétique (65-21 - 14). — Deux spots nets, très distincts, ont été révélés : l'un par le réactif de Nessler et MnO_4K 0,1 N correspondant aux bases aminées, à Rf = 0,98, l'autre par MnO_4K 0,1 N à Rf = 0,45 que l'on peut attribuer à l'apiol de Rf = 0,32; cette différence doit être attribuée à un entraînement par les bases aminées à Rf supérieur. Quoi qu'il en soit, pour s'assurer que ce spot correspond bien à l'apiol, nous avons refait un chromatogramme dans les mêmes conditions, puis nous l'avons découpé en petits carrés de papier, le long de l'ascension du spot, et nous avons pratiqué la réaction de Labat après élution par l'alcool; celle-ci s'est montrée positive uniquement pour le carré de papier correspondant aux Rf compris entre 0,35 et 0,50.

Solvant : eau - alcool butylique n. - acide acétique (66-22,5 - 12,5, phase inférieure). — Ce solvant permet aussi de séparer nettement l'apiol du groupe des bases aminées; les spots sont nets, réguliers, bien délimités :

Premier spot : Rf = 1 (bases aminées);

Deuxième spot : Rf = 0,18 (apiol Rf = 0,17).

Solvant : alcool méthylique. — De même, deux taches ont été mises en évidence : une de Rf = 0,79 correspondant aux bases aminées, l'autre de Rf = 0,88 correspondant à l'apiol (Rf = 0,86).

Solvant : alcool méthylique à 80 p. 100. — MnO_4K 0,1 N met en évidence une seule tache de Rf = 0,86; son aspect montre qu'elle est en voie de division. Les Rf de l'apiol (0,90) et des bases aminées (0,82 témoin 3) sont ici trop proches pour permettre une séparation que, seule, la

chromatographie par voie descendante pourrait effectuer.

Solvant : acide acétique à 50 p. 100. — Pour les mêmes raisons, ce solvant ne permet pas la séparation des deux spots; un seul spot à Rf = 0,98 a été décelé.

Le tableau suivant réunit tous les résultats obtenus :

Solvants	Rf			
	Bases aminées (Témoin 3)	Résidu d'extraction : bases aminées	Résidu d'extraction : apiol	Apiol
Alcool méthylique	0,77	0,79	0,88	0,86
Alcool méthylique à 80 p. 100	0,82	0,86		0,80
Acide acétique à 50 p. 100	0,80	0,98		0,95
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 21 - 14)	0,98	0,98	0,45	0,32
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 22,5 - 12,5) (phase inférieure)	0,98	1	0,18	0,17

L'examen de ce tableau montre que trois des solvants choisis permettent de séparer l'apiol des bases aminées formées pendant la putréfaction des organes; l'apiol ainsi séparé est caractérisé par son Rf spécifique et par l'application à son spot des réactions que nous avons précédemment étudiées et mises au point.

II. — RECHERCHE DE L'APIOL SUR DES VISCÈRES ET DES LIQUIDES BIOLOGIQUES D'ANIMAUX INTOXIQUÉS « PER OS ».

Nous avons fait ingérer à des lapins, par sondage gastrique, une dose déterminée d'apiol émulsionné dans une gelée de gelose; nous en avons suivi l'élimination urinaire et fécale. Les animaux ont été ensuite sacrifiés et l'apiol a été dosé dans les différents viscères : tube digestif, cœur, reins, poumons, muscles, foie, cerveau et, pour certains cas, utérus et placenta maternel.

Nous avons fait ingérer une dose d'apiol de 0,40 g. par kilogramme d'animal.

Les résultats obtenus nous ayant montré qu'une très faible quantité d'apiol était retrouvée dans l'organisme, nous nous sommes demandé si une partie n'était pas éliminée sous forme *dissimulée* (conjugaison).

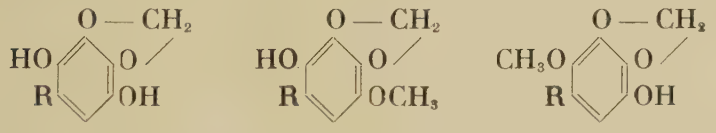
Pour vérifier cette hypothèse, nous avons opéré de la manière suivante :

Après épuisement du liquide d'extraction acétique par trois fois 20 ml. d'éther sulfurique, le liquide d'extraction est additionné du dixième de son volume d'acide chlorhydrique. On chauffe au bain-marie bouillant pendant une heure dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant, puis on effectue un nouvel épuisement à l'éther sulfurique, sur le résidu duquel est pratiquée la réaction de Labat. Une réaction positive prouve qu'une partie de l'apiol se trouvait sous une forme conjuguée, soluble dans l'eau acidulée, non extractible par l'éther sulfurique; l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique l'a libéré et a permis son extraction lors du nouvel épuisement éthéré.

En résumé, nous recherchons :

1° L'apiol libre, de formule classique;

2° L'apiol hydrolysé provenant de l'apiol dissimulé, cet apiol hydrolysé pouvant être représenté par une des trois formules suivantes :



Etude des liquides biologiques

1° *Elimination urinaire*

Nous avons étudié l'élimination de l'apiol par les urines pendant des temps déterminés pour chaque lapin, variables suivant le moment où on les a sacrifiés.

Lapin I. — Poids : 3,900 kg. Apiol ingéré : 1,6 g. (soit 0,41 g. par kilogramme d'animal).

L'élimination a été suivie pendant huit jours; concurremment, nous avons fait l'analyse chimique des urines.

Les résultats sont réunis dans les tableaux ci-contre :

Lapin II. — Poids : 2,200 kg. Apiol ingéré : 0,90 g. (soit 0,41 g. par kilogramme d'animal).

L'élimination urinaire a été suivie pendant trois jours; aussitôt après, l'animal a été sacrifié.

Analyse chimique

	Avant intoxication	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 72 heures
Albumine.....	0	+	+	0
Matières réductrices...	0	+	+	±
Acétone.....	0	+	+	0
Sang.....	0	0	0	0
Dépôt.....	Quelques cristaux d'urate de sodium.	Nombreux cristaux d'urate de sodium. Quelques leucocytes (1 à 2 par champ).	Nombreux cristaux d'urate de sodium. Quelques leucocytes (1 à 2 par champ).	Nombreux cristaux d'urate de sodium. Absence de leucocytes.

Dosage de l'apiol éliminé dans le volume d'urine recueilli

	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 72 heures
Volume d'urine (en ml.)	60	68	60
Apiol (en mg.)	17,28	2,65	0,42
Apiol dissimulé (en mg.)	20,40	0,88	0,57
Apiol total (en mg.)	37,68	3,53	0,99

Lapin III. — Poids : 2,100 kg. Apiol ingéré : 0,80 g. (soit 0,39 g. par kilogramme d'animal).

L'animal a été sacrifié vingt-quatre heures après l'absorption.

LAPIN I

Analyse chimique

	Avant intoxication	Après 12 heures	Après 36 heures	Après 3 jours	Après 4 jours	Après 5 jours	Après 6 jours	Après 8 jours
Albumine	0	++++	++	+	0	0	0	0
Matières réductrices	0	++++	++	+	+	++	+	+
Acétone	0	0	0	0	0	0	0	0
Sang	0	0	0	0	0	0	0	0
Dépôt	Quelques cristaux d'urate de sodium	nombreux cristaux d'urate de sodium						
		Abondants leucocytes (env. 30 par champ)	Quelques leucocytes (8 à 10 par champ)	Rares leucocytes (2 à 3 par champ)	Rares leucocytes (2 à 3 par champ)	Rares leucocytes (2 à 3 par champ)	Absence de leucocytes	Absence de leucocytes

Dosage de l'apiol éliminé dans le volume d'urine recueilli

	Après 12 heures	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 3 jours	Après 4 jours	Après 5 jours	Après 7 jours	Après 8 jours
Volume d'urine en (ml.)	32	11	110	185	295	160	325	150
Apiol (en mg.)	22,8	1,25	4,5	2	1,27	0,57	0	0
Apiol dissimulé (en mg.)	28,1	8,8	23,2	5,4	0,80	0,82	1,1	0
Apiol total	50,9	10,05	27,70	7,4	2,07	1,39	1,1	0

Analyse chimique

	Avant intoxication	Après 24 heures
Albumine	0	++
Matières réductrices	0	+++
Acétone	0	+
Sang	0	0
Dépôt	Quelques cristaux d'urate de sodium.	Abondants cristaux d'urate de sodium. Rares leucocytes (1 à 2 par champ).

Dosage de l'apiol éliminé dans le volume d'urine recueilli

	Après le 1er jour
Volume d'urine (en ml.)	160
Apiol (en mg.)	30,5
Apiol dissimulé (en mg.)	23,2
Apiol total (en mg.)	53,7

Observations. — Il ressort de ces tableaux que l'élimination de l'apiol par les urines est surtout importante pendant le premier jour qui suit l'ingestion; elle diminue très rapidement le deuxième jour pour atteindre des valeurs très basses les jours qui suivent et s'annuler le huitième jour. L'apiol dissimulé suit les mêmes variations, mais se trouve toujours en quantité supérieure.

2° *Elimination par les matières fécales*

Nous avons suivi parallèlement l'élimination de l'apiol par les matières fécales.

Les résultats sont réunis dans les tableaux suivants :

LAPIN I

Dosage de l'apiol éliminé dans les matières fécales recueillies

	1er au 5e jour	6e jour	7e jour	8e jour
Poids des matières fécales (en g.).	1,5	10	34	47
Apiol (en mg.)	4,40	3,40	1,60	0,06
Apiol dissimulé (en mg.)	2,00	1,12	1,40	0
Apiol total (en mg.)	6,4	4,52	3,0	0,06

LAPIN II

Dosage de l'apiol éliminé dans les matières fécales recueillies

	1er jour	2e jour	3e jour
Poids des matières fécales (en g.).	19	44	22
Apiol (en mg.)	0,15	0,60	0,06
Apiol dissimulé (en mg.)	0	0	0,25
Apiol total (en mg.)	0,15	0,60	0,31

LAPIN III

Dosage de l'apiol éliminé dans les matières fécales

	1er jour
Poids des matières fécales (en g.).....	12
Apiol (en mg.)	0,900
Apiol dissimulé (en mg.)	0

Observations. — L'examen de ces tableaux montre que l'élimination de l'apiol par les matières fécales est relativement peu importante; l'apiol dissimulé accompagne généralement l'apiol libre, mais en proportion moindre sinon nulle.

3° *Recherche de l'apiol dans le sang*

La recherche de l'apiolémie a été effectuée trois heures après l'ingestion, ainsi que pendant les heures et les jours qui suivent. Les tableaux ci-après résument les résultats obtenus :

LAPIN I

Taux d'apiol par litre de sang

	Après 3 heures	Après 6 heures	Après 24 heures	Après 72 heures
Apiol (en mg.)	0	0	8,3	4,6
Apiol dissimulé (en mg.) ...	0	0	1,6	1,8

LAPIN II

Taux d'apiol par litre de sang

	Après 3 heures	Après 6 heures	Après 24 heures	Après 72 heures
Apiol (en mg.)	0	2,5	4,6	10,9
Apiol dissimulé (en mg.) ...	0	0	2,1	9,3

LAPIN III

Taux d'apiol par litre de sang

	Après 15 heures	Après 24 heures
Apiol (en mg.)	6,5	5,8
Apiol dissimulé (en mg.)	1,3	1,7

Observations. — Il ressort des tableaux précédents que l'apiol ne passe dans le sang que cinq à six heures après l'ingestion. La concentration maximum paraît être atteinte

environ après vingt-quatre heures; elle baisse ensuite selon un palier à très faible pente. L'apiol dissimulé suit les mêmes variations, mais avec une valeur inférieure.

Etude des viscères

Les animaux furent sacrifiés : les deux premiers, trois jours après l'ingestion d'apiol; le dernier, vingt-quatre heures après. Nous avons dosé l'apiol dans les différents viscères : tube digestif, muscles, cœur, poumons, reins, foie, cerveau, et, dans certains cas, utérus et placenta maternel.

Les doses d'apiol trouvées ont été calculées en milligrammes par kilogramme d'organe.

Les tableaux suivants résument les résultats obtenus :

LAPIN I

Sacrifié trois jours après l'ingestion d'apiol

Organes	Apiol (en mg. par kg. d'organes)	
	libre	dissimulé
Cerveau	0	0
Tube digestif	0	0
Cœur	10,1	20
Reins	15,1	29,7
Muscles	13,8	7,5
Foie	33	76,8
Utérus	34	63,8
Placenta maternel	4	480

LAPIN II

Sacrifié trois jours après l'ingestion d'apiol

Organes	Apiol libre (en mg. par kg. d'organes)	Apiol dissimulé (en mg. par kg. d'organes)
Cerveau	0	0
Tube digestif	12,8	5,7
Cœur	13,7	0
Poumons	75	25
Reins	240	40
Muscles	»	»
Foie	100	129
Utérus	258,3	29

LAPIN III

Sacrifié vingt-heures après l'ingestion d'apiol

Organes	Apiol libre (en mg. par kg. d'organes)	Apiol dissimulé (en mg. par kg. d'organes)
Cerveau	0	0
Tube digestif 1re partie.	50	32,9
Tube digestif 2e partie.	15,6	6,7
Cœur	4,2	7,8
Poumons	79,2	42,8
Reins	186	168
Foie	13,8	47,2
Estomac	0	0

Les tableaux précédents montrent :

— la présence importante de l'apiol libre et dissimulé dans le foie et les reins;

— l'accumulation notable de l'apiol dans l'utérus et le placenta;

— la présence de l'apiol libre et dissimulé dans la plupart des autres organes;

— l'absence d'apiol dans le cerveau;

— sa disparition rapide du tube digestif.

En résumé, si nous faisons les bilans de l'apiol ingéré et de l'apiol retrouvé dans les viscères et les liquides biologiques, nous obtenons les résultats suivants :

		LAPIN I Apiol ingéré : 1.600 mg.		LAPIN II Apiol ingéré : 900 mg.		LAPIN III Apiol ingéré : 800 mg.	
		LIBRE	DISSIMULÉ	LIBRE	DISSIMULÉ	LIBRE	DISSIMULÉ
Apiol (en mg.) retrouvé	Urines .	31	40,9	20,3	21,8	30,5	25,2
	Mat. féc.	1,5	0,4	0,8	0,2	0,9	0
	Visc. . .	45,4	40,6	41,2	25,7	39,4	25,5
		77,9	81,9	62,3	47,7	70,8	50,7
Apiol retrouvé	dissimulé . .	5,1 p. 100		5,2 p. 100		5,7 p. 100	
	libre	4,8 p. 100		6,9 p. 100		8,8 p. 100	

Nous constatons que l'on retrouve environ 10 à 14 p. 100 de l'apiol ingéré; l'apiol libre et l'apiol dissimulé sont dans des proportions à peu près équivalentes.

Nous devons supposer que le reste de l'apiol ingéré a été détruit dans l'organisme ou, du moins, transformé en dérivé non décelable.

Chromatographie des résidus d'extraction des liquides biologiques et des viscères

Afin de caractériser l'apiol d'une manière absolue, nous avons chromatographié certains résidus d'extraction provenant des urines, des matières fécales et de certains viscères.

Les résultats obtenus sont réunis dans les tableaux suivants.

Urines

	Avant hydrolyse	Après hydrolyse	Apiol
Réactif de Nessler.	Négatif	Négatif	Rf
Eau - alcool butylique n. - ac. acétique (65 - 21 - 14).	1er *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,42 2e *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,42	1er *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,41 2e *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,40	0,32
Eau - alcool butylique n. - ac. acétique (65 - 22,5 - 12,5)	1er *exemple* (2 spots) : Rf = 0,97 Rf = 0,17 2e *exemple* (2 spots) : Rf = 0,97 Rf = 0,15	1er *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,51 2e *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,51	0,17
Alcool méthylique.	1er *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,90 2e *exemple* (1 spot très allongé) : Rf = 1	»	0,86
Alcool méthylique à 80 p. 100.	1er *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,94 2e *exemple* (1 spot très allongé) : Rf = 1	»	0,90
Acide acétique à 50 p. 100	1 spot allongé : Rf = 0,92	1er *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,96 2e *exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,97	0,95

Matières fécales

	Avant hydrolyse	Apiol Rf
Réactif de Nessler	Négatif	
Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65 - 22,5 - 12,5), phase inférieure.	*1er exemple* (2 spots) : Rf = 0,93 Rf = 0,15 *2e exemple* (2 spots) : Rf = 0,93 Rf = 0,15	0,17
Alcool méthylique	*1er exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,85 *2e exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,88	0,86
Acide acétique à 50 p. 100.	*1er exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,95 *2e exemple* (2 spots) : Rf = 1 Rf = 0,92	0,95

Viscères

	Solvants	Avant hydrolyse	Après hydrolyse	Apiol Rf
Foie.	Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65-21-14).	2 spots : Rf = 1 Rf = 0,29	2 spots : Rf = 1 Rf = 0,30	0,32
Utérus	Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65-21-14).	1 spot : Rf = 0,28	1 spot : Rf = 0,26	0,32
Placenta	Eau - alcool butylique n. - acide acétique (65-21-14).	2 spots : Rf = 1 Rf = 0,30	2 spots : Rf = 1 Rf = 0,30 (spot avec traînée)	0,32

Si l'on examine les tableaux précédents, nous voyons que, seuls, les deux solvants témoins à base d'eau, d'alcool butylique n. et d'acide acétique, dans les proportions 65 - 21 - 14 et 65 - 22,5 - 12,5 (phase inférieure) permettent une franche séparation de l'apiol et sa caractérisation par un Rf se rapprochant du Rf spécifique de l'apiol. D'autre part, il faut noter que la chromatographie ascendante ne permet pas de séparer nettement l'apiol libre de l'apiol dissimulé, les écarts de leur Rf étant trop peu importants.

CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous avons cherché à mettre en évidence, du point de vue toxicologique, l'apiol utilisé dans un but abortif, en se basant sur des réactions qui ne peuvent nullement prêter à confusion avec des corps du même type.

Ce travail comprend essentiellement quatre parties. La première est un rappel historique. Dans les deux suivantes, nous avons effectué des essais d'identification absolue en mettant en synchronisme l'application de réactions chimiques basées sur la détection d'aldéhydes dérivées de l'apiol, au moyen du réactif hydro-strychnique et de la réaction de Labat appliqués au spot chromatographique. Enfin, dans la quatrième et dernière partie, nous avons entrepris, grâce aux techniques précédentes, la détection toxicologique de l'apiol, tant dans les liquides biologiques que dans les viscères d'animaux expérimentalement intoxiqués *per os* au moyen de ce produit.

Première partie. — Nous avons effectué un rappel de l'origine botanique de l'apiol, de son mode d'extraction selon la technique de Joret et Homolle, ainsi que celle du Codex qui permet d'ailleurs de distinguer les différentes sortes d'apiols commerciaux.

Nous avons mis en valeur les raisons pour lesquelles, après avoir été inscrit au Codex de 1908, l'apiol cristallisé fut supprimé en 1920, à la suite d'accidents dus essentiellement à ses falsifications, puis réinscrit au Codex de 1937 sous forme d'apiol liquide, avec tous les essais permettant

d'éviter sa fraude; malheureusement, une nouvelle falsification à base de phosphate d'orthocrésyle a entraîné contre lui une telle suspicion qu'il a été supprimé du Codex de 1951. La thérapeutique hormonale est sûrement, pour une large part, responsable de cette suppression.

Au point de vue thérapeutique, nous signalons enfin que l'apiol liquide et l'apiol cristallisé ont été d'abord utilisés comme succédanés de la quinine. On s'est ensuite aperçu très rapidement des propriétés emménagogues de l'apiol, bien connues aujourd'hui, ce qui en fait pour cela un médicament abortif de choix pour le public non averti de sa toxicité.

Deuxième partie. — Dans cette deuxième partie, nous avons purement et simplement appliqué la méthode de chromatographie ascendante, selon la technique de Williams et Kirby, à des solutions alcooliques d'apiol. Une étude approfondie des solvants fut faite; elle nous a permis d'en définir plusieurs permettant d'obtenir des spots à Rf parfaitement bien délimités. Ceux qui nous ont donné les meilleurs résultats ont la composition suivante :

Eau - alcool butylique n. - acide acétique : 65 - 21 - 14;

Eau - alcool butylique n. - acide acétique : 65 - 22,5 - 12,5 (phase inférieure).

Cette technique fut également appliquée à l'apioside hétéroside toxique pouvant être contenu dans l'apiol, tant liquide que cristallisé. Grâce à la chromatographie, nous avons montré en outre que l'on pouvait détecter l'apioside en présence de fortes quantités d'apiol, d'où l'application de ce fait au point de vue pharmaceutique.

Mais, à lui seul, le spot d'apiol ne nous a pas paru être un élément suffisant pour affirmer sa présence; c'est la raison pour laquelle nous lui avons appliqué les réactions chimiques classiques, telles que celles de Jorissen et de Labat. Nous avons précisé, pour chacune de ces méthodes, la technique applicable au spot chromatographique, soit

directement, soit après élution. Grâce à la superposition de ces deux techniques : chromatographie et application au spot à Rf apiolique d'une réaction chimique de l'apiol, on peut lever le doute qui planerait sur l'application d'une simple réaction chimique.

Troisième partie. — Nous avons essayé de mettre au point une nouvelle réaction de l'apiol en agissant sur ses fonctions méthoxylées, sa fonction dioxyméthylénique et sa chaîne allylique. La première tentative s'est avérée peu pratique; la deuxième, qui consiste en une hydrolyse acide prolongée, libère effectivement le groupement — O - CH_2O sous forme d'aldéhyde formique que nous avons tenté d'identifier à l'aide du réactif hydrostrychnique.

Nous avons démontré que cette identification est impossible, car le formol libéré vient bloquer la double liaison de la chaîne allylique en donnant un β-glycol primaire-secondaire, s'isomérisant en α-glycol primaire-secondaire qui, instable sous l'action de la chaleur, libère une fonction aldéhydique, d'où l'obtention d'une coloration verte à la place de la coloration bleue que l'on devrait attendre de la libération de formol.

Devant ce fait, nous avons cherché à bloquer cette double liaison, soit par le brome, soit par l'hydrogène; sur le composé ainsi obtenu, nous avons effectué la réaction hydrolytique :

— Lorsque le brome est en excès, il joue le rôle d'oxydant et donne naissance à un aldéhyde; le formol libéré en même temps est transformé en oxyde de carbone; on obtient une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle à la dose d'aldéhyde formé, donc à l'apiol.

— Lorsque le brome est en quantité juste suffisante pour saturer la double liaison, le formol libéré par hydrolyse acide donne, au contact du réactif hydrostrychnique, une coloration bleue caractéristique dont l'intensité est fonction de sa concentration.

— Lorsque le brome est en quantité insuffisante, il y a formation d'un mélange d'aldéhydes d'où l'obtention d'une coloration vert-bleu.

Au point de vue pratique, il est impossible, dans une recherche, d'ajouter exactement la quantité de brome correspondante; il y a toujours défaut ou excès de réactif; en conséquence, de l'apiol traité dans ces deux conditions doit donner : avec un défaut de brome une coloration vert-bleu, avec un excès une coloration verte. En se basant sur ces réactions, nous avons montré que l'on pouvait effectuer un dosage quantitatif dont nous avons précisé les conditions opératoires. Enfin, nous avons également montré que l'on pouvait doser l'apiol par la réaction de Labat au moyen de la méthode des dilutions ultimes.

Quatrième partie. — Détection toxicologique. Cette étude fut divisée en deux chapitres :

1° Recherche de l'apiol ajouté à des organes frais ou putréfiés;

2° Recherche de l'apiol sur des viscères d'animaux intoxiqués *per os*.

Dans les deux cas, nous avons défini une technique d'extraction dérivant de la méthode de Florence.

La détection qualitative et quantitative fut effectuée sur le résidu d'extraction de l'éther acide par la réaction de Labat, nos réactions personnelles et la chromatographie.

L'étude chromatographique du résidu éthéré provenant d'organes putréfiés nous a permis, en particulier, de constater que le spot d'apiol n'était nullement gêné par la présence de produits provenant de la putréfaction. Ce spot d'apiol découpé donne les réactions chimiques avec une parfaite netteté. De nombreux résultats illustrent ces faits.

Ces techniques de recherche furent appliquées aux liquides biologiques (sang, urines) et aux viscères de lapins intoxiqués. L'expérience nous a montré que, contrairement à ce qui a été admis jusqu'ici, il existe une apiolémie.

Après avoir étudié l'élimination urinaire, nous avons défini la localisation de l'apiol dans les principaux viscères et avons montré qu'une très faible quantité de la fraction ingérée était retrouvée sous forme d'apiol libre; nous avons pensé, de ce fait, qu'une fraction pouvait être éliminée sous forme dissimulée, conjuguée par exemple; l'hydrolyse appliquée au résidu aqueux de l'éther acide nous a montré que cette hypothèse était parfaitement vérifiée. L'apiol s'élimine sous forme conjuguée pour une quantité sensiblement égale à celle de l'apiol libre.

Les principaux points mis en évidence sont les suivants :

1° Présence importante de l'apiol libre et dissimulé dans le foie et les reins;

2° Accumulation dans l'utérus et le placenta;

3° Présence notable de l'apiol libre et dissimulé dans tous les organes, sauf le cerveau;

4° Disparition très rapide du tube digestif;

5° Métabolisation de 85 à 90 p. 100 de l'apiol ingéré.

BIBLIOGRAPHIE

ANWERS. — *Ber. Deutsch. Chem. Gesel.*, 1903, **36**, 3890.

ASTRUC & GIROUX. — Traité de pharmacie galénique. Maloine édit., Paris, 1950.

BLASS, MACHEBŒUF & NUNEZ. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, **32**, 130.

BOUGAULT. — *Bull. Soc. Chim.*, 1901, **23**, 643 et 760; 1901, **25**, 338.

CASTAGNOU, CAZAUX & PAUL. — *Bull. de la Soc. Pharm. de Bordeaux*, 1951, **81**, 26.

CASTAGNOU & QUILICHINI. — *Bull. de la Soc. Pharm. de Bordeaux*, 1952, **90**, 16, 20 et 118.

CHAPELLE. — *Journ. Pharm. et Chim.* (8), 1933, **17**, 22.

CIAMICIAN & SILBER. — *Ber. Deutsch. Chem. Gesel.*, 1892, **25**, 1471.

Codex. — Pharmacopée française.

DENIGÈS, CHELLE & LABAT. — Précis de chimie analytique. Maloine édit., Paris.

DENT. — *Biochem. J.*, 1947, **41**, 240.

DUBAIL. — *Journ. Pharm. et Chim.* (3), 1855, **28**, 212.

FABRE (R.). — Leçons de toxicologie. *Act. Sc. et Ind.*, Hermann édit., Paris, 1935.

FOULSCHIÉ (DE) & REUTTER DE ROSEMONT. — Précis de méthodes analytiques de chimie végétale et de chimie biologique. M. Lamertin édit., Bruxelles.

GAASMAN. — *C. R. Acad. Sc.*, 1897, **124**, 38.

GIBAULT. — Histoire des légumes. Librairie horticole, 1912.

GORDO. — *Trab. Inst. nacion. Ci. med.*, 1943-1944, **2**, 643-690.

GORIS (A.), LIOT (A.) & GORIS (André). — Pharmacie galénique. Masson édit., Paris, 1948.

GRIGNARD. — *Traité de Chimie organique*, Paris, 1948, **6-7**. Masson, édit.

HARTEMAN & GATTERMAN. — *Ber. Deutsch. Chem. Gesel.*, 1892, **25**, 3521.

HERBAIN. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **5-6**, 1104.

HORROCKS. — *Nature*, 1949, **164**, 443.

IONESCU, MATIN & POPESCO. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 671.

JORISSEN. — *Journal de Pharmacie de Liège*, 1900, 70; *C. Z.*, 1901, **1**, 135.

LABAT. — *Bull. Soc. Chim. de France* (4), 1909, **5**, 745.

LEBEAU & COURTOIS. — Traité de pharmacie chimique. Masson édit., Paris, 1946.
LESPAGNOL. — Traité de pharmacie chimique. Vigot édit., Paris.
LESPAGNOL & MERVILLE, — *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1941, **18,** 280; *Bull. Soc. Biol.*, 1941, **135,** 1366.
LUTZ & OUDIN. — *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1909, **16,** 68; 1910, **17,** 7 et 209; 1911, **18,** 73.
MACHEBŒUF & BLASS. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73,** 1053.
MERCIER & VIGNOLI. — *Bull. Soc. Biol.*, 1935, **34,** 629; 1935, **118,** 170.
MEYER. — Précis d'analyse et détermination de la composition des composés organiques.
MONTREUIL. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31,** 1639.
MOURGUES. — Thèse méd., Paris, 1890.
MUNIER & MACHEBŒUF. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31,** 1144.
PARTRIDGE. — *Nature*, 1946, **158,** 270; *Biochem. J.*, 1948, **42,** 238; 1948, **42,** 251.
PATEIN, BRISSEMORET & CHEVALIER. — *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1910, **17,** 98.
PATOIR, BÉDRINES & PAYEN. — *Bull. Soc. Biol.*, 1935, **120,** 192.
PLUMEL. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **5-6,** 1163.
POLEK. — *Ber. Deutsch. Chem. Gesel.*, 1888, **21,** 2861.
THEODORESCU. — *Bull. Sc. méd. et nat. de Jassy*, 1905.
THOMS. — *Ber. Deutsch. Chem. Gesel.*, 1890, **36,** 3451; 1892, **41,** 2753.
TIFFENEAU. — *Bull. Acad. Méd.*, 1933, **109,** 121.
VERLEY. — *Bull. Soc. Chim.*, 1901, **25,** 48; 1924, **35,** 1653.
VIGNOLI. — *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1933, **40,** 344.
WATTIEZ & STERNON. — Eléments de chimie végétale. Masson édit., Paris, 1935.
WILLIAMS & KIRBY. — *Science*, 1948, **107,** 481.
WOLFF (DE). — *Pharmaceutisch. Weekblad.*, 1951, **19-20,** 335.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE PREMIER. — GÉNÉRALITÉS SUR L'APIOL 3

CHAPITRE II. — ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'APIOL ET DE L'APIOSIDE 11

I. — Etude de l'apiol 11

II. — Etude de l'apioside 18

III. — Application galénique 23

CHAPITRE III. — ETUDE CHIMIQUE DE L'APIOL 25

I. — Action sur la fonction dioxyméthylénique 26

1° Réaction de Labat 26

2° Saponification ou hydrolyse 28

II. — Action sur les fonctions méthoxylées 29

III. — Action sur la chaîne allylique 29

IV. — Action simultanée sur la chaîne allylique et le groupement dioxyméthylénique 33

CHAPITRE IV. — ETUDE TOXICOLOGIQUE DE L'APIOL 40

Techniques utilisées 40

I. — Recherche sur des viscères artificiellement enrichis en apiol 42

Viscères frais 42

Viscères putréfiés 44

II. — Recherche sur des viscères et des liquides biologiques d'animaux intoxiqués *per os* 48

Liquides biologiques 49

Elimination urinaire 49

Elimination par les matières fécales 52

Recherche de l'apiol dans le sang 54

Viscères 55

CONCLUSIONS 61

BIBLIOGRAPHIE 67

Bordeaux. — Impr. E. DROUILLARD, place de la Victoire, 3.

QUESTION PROPOSÉE PAR LA FACULTÉ

LA VITAMINE B 12 :

CONSTITUTION, PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES, TECHNIQUES DE DOSAGE, ROLES BIOLOGIQUES.

Vu :
Pour le Doyen :
L'Assesseur,
R. SIGALAS.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
R. CASTAGNOU.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 18 Juillet 1952.
Le Recteur,
E. DELAGE.